



UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT ET SOCIETE
UNIVERSITE DE LIEGE



Thèse en Convention de Cotutelle Internationale
présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES –
POPULATIONS – INTERACTIONS

Mention : Biologie des populations et écologie

Soutenue publiquement par
Marie GARRIDO

le 06 Décembre 2012

Structure et fonction des communautés phytoplanctoniques en
milieux côtiers marin et lagunaire (Méditerranée – Corse)
dans une optique de gestion

Rapporteurs :

M. Rutger DE WIT, DR-CNRS, Université de Montpellier 2
M. Jean-Marie BOUQUEGNEAU, Pr, Université de Liège

Directeur(s) :

Mme Vanina PASQUALINI, Pr, Université de Corse
M Jean-Henri HECQ, (AES) MR-FNRS, Université de Liège

Jury :

M. Rutger DE WIT, DR-CNRS, Université de Montpellier 2
M. Jean-Marie BOUQUEGNEAU, Pr, Université de Liège
M. Bernard MARCHAND, Pr, Université de Corse
Mme Anne GOFFART, Dr, Université de Liège
M Jean-Henri HECQ, MR-FNRS (AES), Université de Liège
Mme Vanina PASQUALINI, Pr, Université de Corse

Membres invité :

M. Philippe CECCHI, CR, Institut de Recherche pour le Développement
M. Guy-François FRISONI, Dr, Directeur O.E.C.



**THESE DE DOCTORAT
UNIVERSITE DE CORSE ET UNIVERSITE DE LIEGE**

**Mention
Biologie des populations et écologie**

Présentée par
M^{elle} Marie GARRIDO

Pour obtenir le grade de
**Docteur en Physiologie et Biologie des organismes
Populations – Interactions**

**Structure et fonction des communautés
phytoplanctoniques en milieux côtiers marin et lagunaire
(Méditerranée – Corse) dans une optique de gestion**

Soutenue le 06 Décembre 2012 à Corte

Devant le jury composé de :

M. Rutger DE WIT, Rapporteur
M. Jean-Marie BOUQUEGNEAU, Rapporteur
M. Bernard MARCHAND, Examineur
Mme Anne GOFFART, Examineur
M. Jean-Henri HECQ, Co-directeur de thèse
Mme Vanina PASQUALINI, Directrice de thèse
M. Philippe CECCHI, Membre invité
M. Guy-François FRISONI, Membre invité

**« Il y a deux façons de vivre sa vie l'une est de penser que rien est un miracle,
l'autre est de penser que chaque chose est un miracle »**

A. Einstein

A tous ceux que j'aime...

Remerciements

3 ans plus tard, nous y sommes, j'écris enfin ces dernières lignes qui présagent la fin très proche de cette aventure. La thèse est synonyme d'enrichissement personnel, de rencontres, de projets, de stress, de dépassement de soi... La recherche n'est pas seulement une activité solitaire et ce qui peut être présenté comme un travail personnel, je le dois à de nombreuses collaborations. Je tiens à exprimer ma reconnaissance ici à tous les chercheurs, techniciens, allocataires, stagiaires, marins, administratifs, amis et famille qui, de près ou de loin, ont contribué à faciliter l'ensemble de mes activités. Même si toutes ces personnes ne sont pas citées ici, je ne les ai pas oubliées et je les remercie du fond du cœur. Donc pour faire simple et pas très original...

Tout d'abord je voudrai exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ces 3 années de travail. Je souhaite remercier tout particulièrement Messieurs Rutger De Wit et Jean-Marie Bouqueneau qui sont rapporteurs de cette thèse.

C'est avec grand plaisir que j'exprime toute ma reconnaissance et mes plus profonds remerciements à ma directrice de thèse, Vanina Pasqualini. Un MERCI incommensurable pour avoir été présente durant ces 3 années, en plus d'être ma directrice, elle est devenue, au fil des années, une personne que j'apprécie tout particulièrement. Je la remercie pour sa patience, sa compréhension et son honnêteté dont elle a su faire preuve au cours de notre collaboration, je pense sortir de cette expérience métamorphosée. Merci de m'avoir ouvert les portes de la recherche et de m'avoir donné ma chance.

Merci également à M. Bernard Marchand, responsable du projet « Gestion et valorisation des Eaux en Méditerranée » à l'Université de Corse, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant ces 3 années.

Je remercie Anne Goffart et Jean-Henri Hecq, co-directeurs de cette thèse, qui m'ont accompagnée dans l'approche planctonique et pour toutes les découvertes hors-thèse. Un grand merci également à Amandine Collignon, ma partenaire dans cette aventure belge.

Un grand MERCI à Philippe Cecchi pour la part importante qu'il a prise dans mes travaux de recherche et plus particulièrement pour son aide, oh ! Combien précieuse dans l'apprentissage et l'analyse des données du Phyto-PAM. Je lui exprime toute mon amitié. Malgré la distance, Burkina/Corte, nous avons pu travailler dans la bonne humeur et la rigueur. Je n'ai pas oublié ta pince...

Merci à Antoine Aiello, directeur de la plateforme Stella-Mare et à toute l'équipe qui m'ont toujours accueillie avec une grande gentillesse, pour leur disponibilité et pour leurs nombreux encouragements. Merci à Sylvia Agostini et Paul-Antoine Bisgambiglia pour leur confiance et leur aide.

Je tiens à remercier Joseph Castelli, président du Conseil Général de Haute-Corse ainsi que François Orlandi, conseiller général de la Haute-Corse pour m'avoir permis de réaliser mes prélèvements dans la Réserve Naturelle de l'Étang de Biguglia. Un grand Merci à Georges Valentini, Directeur de la Réserve Naturelle de l'Étang de Biguglia, pour sa confiance et son accueil, également à Sabrina Etourneau, Jean-Louis, Fred, Paul et Philippe, pour les nombreuses sorties sur l'étang et cela toujours avec le sourire, malgré les heures parfois très matinales et les conditions météorologiques pas toujours clémentes.

Mes sincères remerciements à Yves Collos, Béatrice Bec, André Vaquer, Francesca Vidussi, ainsi que les chercheurs de l'Université de Montpellier pour leur aide lors de l'identification et leurs nombreux conseils. Merci également aux chercheurs de l'IRD de l'Université de Montpellier.

Un grand MERCI à Alain Couté et Catherine Perrette, du Muséum National d'Histoire Naturelle. L'apprentissage du MEB fut une réelle partie de plaisir en votre compagnie. Je garderai un très bon souvenir de ces moments passés ensemble et surtout j'ai pu enrichir en quelques jours mon vocabulaire en Français, comme en Allemand ! Merci à Cécile Bernard pour son accueil au sein de l'équipe Cyanobactéries, Cyanotoxines et Environnement du MNHN.

Merci à Patrick Rébillout et Jean-Paul Giorgetti, de la station de Météo-France d'Ajaccio, pour leur aide dans la description des conditions climatiques et pour m'avoir aidé à percer les mystères de la climatologie.

Je tenais à remercier également IFREMER, particulièrement Valérie Orsoni, Yoann Baldi et Nathalie Malet pour leur collaboration dans le cadre du partage des données concernant la lagune de Biguglia et Luis Lampert pour la diffusion de ses connaissances bibliographiques sur les pigments.

Merci à l'équipe de la Stareso pour leur accueil et également aux personnels de l'Université de Liège.

Je remercie Guillaume De Liège, pour sa joie de vivre et ses idées qui changent tout, sans qui, également les missions terrains auraient été ennuyeuses !

Merci à Alexandre Vela pour sa contribution lors des missions terrain !

Je voulais remercier tous les thésards et stagiaires, qui tous, sans exception, se sont révélés de joyeux collaborateurs et qui ont fait que cette thèse s'est déroulée dans une ambiance formidable. Une spéciale dédicace à Jean-Jo, Bastien et le petit dernier, Alexandre dit Baloo by Nana. Merci pour le « bureau cocon » que vous m'avez offert durant ces 3 ans. Merci aussi à tous mes voisins du bâtiment 018 qui, par leur présence enrichissante, m'ont apporté leur aide à leur façon, peut-être même sans le savoir. Marina ou Manina pour les intimes... merci pour les Kinder Schoko-Bons qui tombent toujours aux bons moments et les pauses café nécessaires notamment pour « vider son sac » et les nombreuses sorties ! Olivia merci pour cette oreille attentive aux moments les plus cruciaux. Merci également à Michel (ah bon !), Jo, Emilie, Pauline, Anne, Meriem, Manue, Benjamin, Bahaa, Nassim, Morgane... ces moments passés ensemble resteront pour moi des instants de partage.

Un grand merci à mes amis de l'association Pro-Doc, Candice, Christelle, Greg, Jean-Jo et « el presidente » Pierre. J'ai vécu de très bons moments avec vous et surtout une très belle aventure ! J'espère, et je ne doute pas, que l'on se reverra très souvent après cette grande aventure.

Je souhaite remercier du fond du cœur ma famille, belle-famille et mes amis, qui m'ont toujours soutenue, épaulée, encouragée et aidée chaque fois qu'ils le pouvaient. Merci au petit Gabriel pour tous ces moments de joies et à ses

parents, Alexandra et Jérôme pour me faire partager tous leurs instants de bonheur. Alexandra, merci pour ton soutien, ta bonne humeur, tes histoires impossibles (sachant qu'impossible n'est pas Alexandra) et surtout pour être toujours présente pour moi. Merci à Marion et Pierre-Charles pour les escapades régulières et les « apéros » détente au Lamparo. Merci à Catherine et Séverine pour les 4 jours magnifiques que nous avons passé ensemble entre Ajaccio et Porto-Vecchio, c'était GENIAL!

Un grand merci à ma Auré qui me supporte (ou pas...!) depuis que nous avons entrepris cette ascension à l'Université de Corse et sans qui rien ne serait plus pareil. Au-delà du fait que tu sois ma meilleure amie, je te considère comme ma sœur ! Je pense que notre devise peut être cette dernière : « la vie ça ne se respire qu'une seule fois et le bonheur ça se vit sans aucune loi ».

A mes Parents et à mon frère, sans écrire un roman, je voudrais dire que vous avez toujours cru en moi, vous m'avez laissée prendre mes décisions en me faisant confiance et en me soutenant, vous m'avez toujours encouragée. Je mesure les sacrifices que vous avez consentis pour me permettre d'atteindre mes objectifs. C'est auprès de vous tous que je peux me changer les idées, me défouler, me ressourcer quand ça déborde là-dedans. J'éprouve pour vous 3 un amour infini.

Ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans l'aide et le soutien de François. Il a fait preuve d'une patience et d'un courage extraordinaires en faisant le choix de vivre avec une thésarde. Il a supporté mes absences parfois longues et m'a apporté bien plus que son soutien et son temps. Mon Amour MERCI de m'avoir suivie dans cette aventure, dans les bons comme dans les mauvais moments, et de l'avoir vécue avec moi au quotidien. Tu m'as donné des ailes. Tu as contribué à l'élaboration de ce travail, tu m'as sauvée à maintes reprises. Rien n'est possible sans toi...

Liste des abréviations

Chl α : Chlorophylle α

HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography)

PAM: Pulse Amplitude Modulated

MS: Mediterranean Sea

PSU: Practical Salinity Unit

NTU: Nephelometric Turbidity Unit

AL: actinic light

Ek: irradiance at the onset of light saturation

F: variable basal fluorescence under actinic light

F'm: maximum fluorescence yield in light-acclimated state

F'o: minimal fluorescence yield in light-acclimated state

Fm: maximum fluorescence yield after dark acclimation

Fo: minimal fluorescence yield after dark acclimation

Fv/Fm: maximum PSII efficiency

Kc: light attenuation coefficient

ML: modulated light

PAM: Pulse Amplitude Modulated fluorometry

rETR: relative electron rate

RLC: Rapid Light Curve

α : light efficiency factor

PSII: photosystem II

ϕ PSII: effective quantum yield in photosystem II

SP: Saturating Pulse

FP: FluoroProbe®

WFD: Water Framework Directive

WMB: Western Mediterranean Basin

CSE: Contaminated Sediment Elutriate

RNEB: Réserve Naturelle de l'Etang de Biguglia

CG2B: Conseil Général de la Haute-Corse

Source des illustrations dans le manuscrit

Page 1 : Source Internet

Page 22 : Source Internet

Page 31 : M. Garrido

Page 54 : Source Internet

Page 68 : M. Garrido d'après carte SHOM 7025

Page 88 : Conseil général de la Haute-Corse

Page 111 : M. Garrido

Page 139 : M. Garrido

Page 164 : Source Internet

Résumé

Les écosystèmes côtiers contribuent de manière importante à la production primaire des océans. De par leur position géographique, ils sont particulièrement sensibles à l'eutrophisation. Le compartiment phytoplanctonique y joue un rôle prépondérant au regard de sa position dans la chaîne trophique, mais également en termes de diversité. Il est également capable d'intégrer et/ou de refléter les changements environnementaux qui s'opèrent à court, moyen et long terme.

Cette thèse vise à renforcer les connaissances sur la dynamique et la fonction des communautés phytoplanctoniques par rapport aux conditions environnementales dans deux écosystèmes côtiers, en utilisant des techniques traditionnelles comme la microscopie, l'HPLC et d'autres plus récentes comme le Phyto-PAM et la FluoroProbe. Le littoral corse a été choisi comme site d'étude. En effet, ses 1 047 km de côtes regorgent d'écosystèmes particulièrement dynamiques, d'une richesse biologique importante et de zones d'interfaces productives (e.g. structure frontale, milieu lagunaire). Malgré cela, il existe peu de données concernant la dynamique et la fonction de ces micro-algues, aussi bien en milieu marin côtier que lagunaire. Une fréquence d'échantillonnage appropriée à l'échelle d'observation a été utilisée selon les écosystèmes étudiés et le type d'étude menée (*in situ* ou expérimentale), allant de prélèvements mensuels à des prélèvements journaliers.

Dans un premier temps, nous avons poursuivi les efforts engagés depuis plusieurs années concernant l'amélioration des méthodes d'analyses spectrofluorimétriques nécessaires pour l'étude de la dynamique et l'analyse fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques. Des recommandations concernant les conditions de conservation des échantillons (i.e. durée, température) ont été dégagées pour l'analyse au Phyto-PAM, afin d'affiner les limites d'utilisation de cet outil. Nous avons également testé l'utilisation de la FluoroProbe dans les écosystèmes côtiers en Méditerranée.

Dans un second temps, nous avons étudié la variabilité spatio-temporelle des communautés phytoplanctoniques en milieu marin côtier (Calvi et Bastia) et en milieu lagunaire eutrophisé (Réserve Naturelle de Biguglia). Les résultats ont mis en avant une succession écologique et une structure des peuplements phytoplanctoniques différentes dans les deux écosystèmes marins côtiers étudiés, présentant des spécificités locales propres et comparés à l'échelle des zones côtières en Méditerranée. Nous avons démontré que des événements météorologiques pouvaient influencer les variations observées, agissant directement sur l'abondance des espèces ou indirectement sur les conditions du milieu (e.g. nutriments). Au niveau lagunaire, les actions de gestion mises en œuvre ont impacté la structure et l'efficacité photosynthétique des communautés phytoplanctoniques. Les modifications des flux hydrologiques ont exacerbé le caractère confiné de la lagune et des efflorescences successives d'espèces opportunistes et non profitables au réseau trophique supérieur ont été observées.

Ces études ont permis de fournir une aide scientifique en ce qui concerne la prise de décision qui incombe aux acteurs de l'environnement et plus particulièrement les gestionnaires, dans une optique de gestion.

Mots-clés : Méditerranée, Corse, phytoplancton, écosystèmes marin côtier et lagunaire, dynamique spatio-temporelle, efficacité photosynthétique, eutrophisation, stress, gestion

Abstract

Coastal ecosystems contribute in a significant way to oceans' primary production. By their geographical position, they are particularly sensitive to eutrophication. Phytoplanktonic compartment plays a predominant role with regards its position as primary producer, but also in terms of diversity. It is also able of integrating and/or reflecting the environmental changes that take place in the short, medium and long term.

This thesis is aimed at reinforcing knowledge about the dynamics and the function of phytoplanktonic communities in relation to environmental conditions in two coastal ecosystems, by using traditional techniques like microscopy and HPLC and more recent techniques like Phyto-PAM and FluoroProbe. The coast of Corsica was chosen as the site for the proposed study. In fact, its 1 047 km of coastline are packed with particularly dynamic ecosystems, significant biological resources and productive interface areas (e.g. frontal structure, lagoon environment). Despite this, there is little data concerning the dynamics and function of these micro-algae, in both the coastal marine environment and the lagoon environment. A sampling rate adapted to the scale of observation was used according to the ecosystems studied and the type of study conducted (*in situ* or experimental), ranging from monthly sampling to daily sampling.

To start with, we pursued the endeavours undertaken for several years concerning improving spectrofluorimetric analysis methods needed to study the dynamics and the functional analysis of phytoplanktonic communities. Recommendations concerning sample preservation conditions (i.e. duration, temperature) have been highlighted to analyse using Phyto-PAM, to refine the limits for using this tool. We also tested the use of FluoroProbe in coastal ecosystems in the Mediterranean.

Secondly, we studied the spatiotemporal variability of phytoplanktonic communities in coastal marine environments (Calvi and Bastia) and in eutrophicated lagoon environments (Natural Reserve of Biguglia). The results highlighted an ecological succession and a structure of different phytoplanktonic populations in both coastal marine ecosystems studied, presenting their own local specificities and compared with the scale of coastal areas of the Mediterranean. We have shown that meteorological events could influence the observed variations, acting directly on the abundance of species or indirectly on environment conditions (e.g. nutrients). With regard lagoons, management initiatives implemented had an impact on the structure and photosynthetic effectiveness of phytoplanktonic communities. Modifications to hydrologic fluxes have heightened the confined nature of the lagoon and successive efflorescence of opportunistic and non-profitable species in the superior food chain were observed.

These studies provided management assistance, notably in making those decisions that lie with managers, with the aim of environmental management.

Key words: Mediterranean Sea, Corsica, phytoplankton, coastal marine and lagoon ecosystems, spatio-temporal dynamics, photosynthetic efficiency, eutrophication, stress, management

Sommaire

Chapitre I: Introduction générale.....	1
I.1. Écosystème planctonique	2
I.2. Phytoplancton : vue synoptique	4
I.2.1. Rôles et importances écologiques	5
I.2.2. Dynamique des communautés phytoplanctoniques	7
I.3. Approches des méthodes d'analyse appliquées au phytoplancton.....	11
I.3.1. Mesures de la structure	11
I.3.2. Mesures de la fonction.....	15
I.4. Contexte des zones côtières en Méditerranée	16
I.5. Approche et orientation de la thèse.....	18
 Chapitre II: Écosystèmes côtiers étudiés en Corse.....	22
II.1. Contexte géographique et socio-économique	23
II.2. Écosystème marin côtier	25
II.2.1. Côte Ouest : la baie de Calvi.....	25
II.2.2. Côte Est : le littoral de Bastia	26
II.3. Écosystème lagunaire	28
II.3.1. Lagune de Biguglia.....	29
 Chapitre III: Effects of samples conservation on photosynthetic efficiency assessment of phytoplankton using PAM fluorometry.....	31
III.1. Introduction	32
III.2. Materials and methods.....	35
III.2.1. Study site and sampling procedures	35
III.2.2. Experimental procedures	37
III.2.3. Fluorescence measurement.....	38
III.2.4. Pigment degradation.....	40
III.2.5. Statistical analysis.....	40
III.3. Results.....	41
III.3.1. Environmental context.....	41
III.3.2. Conservation conditions.....	41
III.3.3. Quantum yield of photosystem II	42
III.3.4. Rapid light curves	43
III.3.5. Pigment degradation.....	46
III.4. Discussion	47
III.5. Recommendation	52

Chapitre IV: Quantification and taxonomic discrimination of phytoplankton in coastal environments (Mediterranean Sea) using FluoroProbe®: Preliminary *in situ* and *in vivo* results.....54

IV.1. Introduction	55
IV.2. Materials and methods.....	58
IV.2.1. Study area and sampling sites.....	58
IV.2.2. Spectro fluorometer analysis: FluoroProbe.....	58
IV.2.3. Pigment determination	59
IV.2.4. Statistical analysis.....	60
IV.3. Results.....	60
IV.4. Discussion	65

Chapitre V: Variability of phytoplankton communities in two contrasting coastal ecosystems in relation to environmental factors (Corsica, NW Mediterranean Sea).....68

V.1. Introduction	69
V.2. Materials and methods.....	72
V.2.1. Sampling strategy.....	72
V.2.2. Physico-chemical measurements.....	73
V.2.3. Phytoplankton analysis	73
V.2.4. Zooplankton analysis.....	74
V.2.5. Statistical analysis.....	74
V.3. Results.....	75
V.3.1. Phytoplankton variation and structure.....	75
V.3.2. Zooplankton variation	80
V.3.3. Physico-chemical parameters	81
V.4. Discussion	83

Chapitre VI: Can water fluxes management improved structure and photosynthetic efficiency of the phytoplankton communities? A case study in an eutrophic coastal Mediterranean lagoon88

VI.1. Introduction	89
VI.2. Materials and methods.....	93
VI.2.1. Study site and sampling strategy	94
VI.2.2. Physical and chemical variables.....	94
VI.2.3. Phytoplankton analysis	95
VI.2.4. Fluorescence measurements	95
VI.2.5. Statistics	96
VI.3. Results.....	97
VI.3.1. Environmental conditions	97
VI.3.2. Variations of phytoplankton structure	99
VI.3.3. Photosynthetic efficiency of phytoplankton.....	103
VI.4. Discussion	105

Chapitre VII: Impact of contaminated sediment resuspension on phytoplankton in a Mediterranean lagoon: Functional and structural responses.....111

VII.1. Introduction	112
VII.2. Material and method.....	114
VII.2.1. Study area.....	114
VII.2.2. Sediment elutriate preparation and contaminant analysis	115
VII.2.3. Microcosm experiment	116
VII.2.4. Analysis of photosynthetic activity efficiency.....	116
VII.2.5. Phytoplankton group discrimination by fluorometry	117
VII.2.6. HPLC pigment analysis	117
VII.2.7. Microscopy analyses	118
VII.2.8. Flow cytometry analyses.....	118
VII.2.9. Statistical analysis.....	119
VII.3. Results.....	119
VII.3.1. Contaminant concentrations in sediment and elutriates.....	119
VII.3.2. Physico-chemical parameters	123
VII.3.3. Fluorescence parameters.....	125
VII.3.4. Phytoplankton groups discriminated by fluorometry	126
VII.3.5. Chemotaxonomic data	129
VII.3.6. Microscopy data	131
VII.3.7. Flow cytometry data	131
VII.4. Discussion	134

Chapitre VIII: Synthèses et perspectives139

VIII.1. Considérations méthodologiques.....	140
VIII.1.1. Recommandations d'utilisation du Phyto-PAM.....	140
VIII.1.2. Validation de l'utilisation de la FluoroProbe® dans les zones côtières en Méditerranée	142
VIII.2. Apports scientifiques fondamentaux	144
VIII.2.1. Spécificités locales et similitudes dans la dynamique phytoplanctonique de deux écosystèmes contrastés marins côtiers en Corse	144
VIII.2.2. Vers une meilleure compréhension de la diversité taxonomique et fonctionnelle de la lagune de Biguglia	150
VIII.3. Apports scientifiques à la gestion.....	157

Chapitre IX: Bibliographie.....164

CHAPITRE I

Introduction générale



I.1. Écosystème planctonique

L'écosystème planctonique était encore méconnu au début du 19^e siècle. Dans le passé, de rares allusions au plancton concernaient essentiellement des espèces visibles à l'œil nu. Le terme « *planktos* », employé à l'origine par Homère, dans l'Odyssée, pour désigner les animaux errant à la surface des flots, a été défini scientifiquement, lors des études pionnières en planctonologie. Charles Darwin dans L'Origine des espèces en 1859, fut l'un des premiers à décrire, puis à tenter d'expliquer la diversité du vivant et les relations entre les organismes dans leur environnement. C'est Victor Hensen, en 1887, qui donne une première définition du plancton : « *ensemble des organismes qui flottent dans l'eau à la merci des courants, mais indépendants du fond comme de la rive* ». À cette époque, il n'apparaissait pas encore fondamental de s'intéresser au plancton. Ernst Haeckel, biologiste, philosophe et libre penseur allemand, disait, en désignant ces micro-organismes, « *ce qui est petit est beau, mais sans importance* », ce qui concorde avec les idées d'Otto Friedrich Müller, zoologiste danois, pour qui l'étude du plancton correspondait à « *une poussière philosophique* ». Guy Jacques, spécialiste du phytoplancton marin, directeur de recherche émérite au CNRS, avait débuté une conférence en 2009 en disant « *que ces deux là auraient mieux fait de ne pas utiliser leurs plumes* » !

En effet, l'évolution des techniques de prélèvement et d'observation a permis l'étude d'organismes de plus en plus petits. Les scientifiques ont pu constater ainsi la variabilité géographique de la distribution du plancton et mettre en évidence que son existence et son abondance sont en étroite correspondance avec les caractéristiques du milieu. Le rôle des micro-organismes planctoniques dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques est ainsi apparu essentiel. En 1960, quand l'océanographie prend son véritable essor, les recherches sur le plancton sont encouragées pour comprendre les mécanismes du réseau trophique dans l'optique d'une meilleure exploitation des ressources vivantes. C'est dans les années 70 que certains travaux, comme ceux de Jeffrey (1976), suggèrent la contribution importante de très petits organismes photosynthétiques à la production primaire des zones océaniques, zones qui étaient considérées jusque là comme de vastes déserts biologiques. Sieburth *et al.* (1978) proposeront le terme de picoplancton pour caractériser ces micro-organismes dont la taille est inférieure à 2 μm . Andersen (1992) a démontré que

l'écosystème pélagique (le plus vaste écosystème planétaire) est dominé par des picoeucaryotes.

Le plancton est réparti le plus souvent en classe de taille, paramètre le plus anciennement employé. Sur la base de ce critère, Dussart (1965) proposera une classification que Sieburth *et al.* (1978) compléteront en y ajoutant quelques termes (Figure I.1). Ces différentes dénominations permettent ainsi de mieux répartir les organismes et de les séparer par des méthodes de filtration différentes. De plus, ils correspondent aux échelles dimensionnelles des relations proie-prédateur, mais également à la réponse des organismes face à la viscosité du milieu en fonction de leur taille.

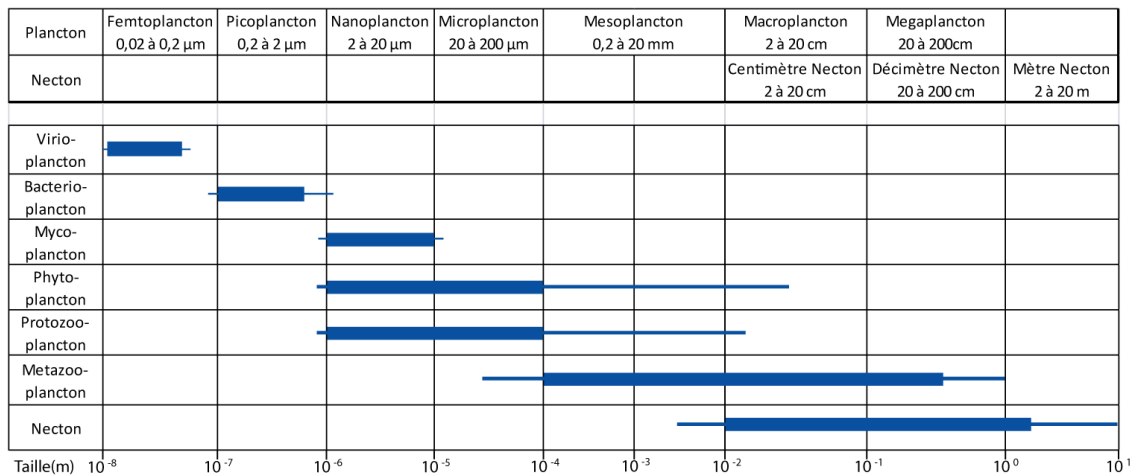


Figure I.1. Distribution des différents compartiments trophiques du plancton et du necton (d'après Sieburth *et al.*, 1978).

Le picoplancton, de taille comprise entre 0.2 et 2 µm, est constitué de bactéries hétérotrophes et de Cyanophyceae (Johnson & Sieburth, 1979 ; Campbell *et al.*, 1994). Le nanoplancton, dont la taille varie entre 2 et 20 µm, est composé essentiellement de Prymnesiophyceae et de Dictyochophyceae. Les organismes de taille comprise entre 20 et 200 µm forment le microplancton, composé de Diatomophyceae et de Dinophyceae pour le microphytoplancton (Sieburth *et al.*, 1978) et, concernant le microzooplancton ou protozooplancton, d'importance considérable pour l'écosystème planctonique, il est constitué essentiellement de Dinophyceae hétérotrophes, de Ciliata, ainsi que de copépodes juvéniles et quelques organismes appartenant au mésozooplancton. Le mésoplancton a des dimensions comprises entre 200 et 20 000 µm. Il comprend essentiellement du zooplancton,

dont le grand groupe des copépodes. Au-delà, le macroplancton et le mégaplancton, sont essentiellement constitués d'Euphausiacea, de méduses et de salpes.

De nos jours des techniques telles que : la cytométrie en flux pour le phytoplancton ou la détection acoustique pour le zooplancton s'affranchissent de cette sélection dimensionnelle.

En dehors des critères de taille, des critères de répartition spatiale verticale dans la colonne d'eau peuvent être appliqués. Il existe également des critères systématiques quantitatifs et qualitatifs (Hecq, 2003). Nous verrons à l'issue de ce travail que ces nombreux éléments permettent de caractériser certains milieux ou masses d'eau.

I.2. Phytoplancton : vue synoptique

Le monde océanique abrite une grande biodiversité d'organismes (Gray, 1997). Parmi eux, le phytoplancton, qui fait l'objet du présent travail, dont le nom vient du grec : « *phyton* » : plante et de « *planktos* » : errant. Ce terme désigne donc les organismes photosynthétiques, autotrophes, peu mobiles, voire incapables de se mouvoir et par conséquent ne pouvant lutter contre les courants. Ces organismes, de taille presque toujours inférieure, au millimètre dépendent de la lumière et des nutriments disponibles (Sournia *et al.*, 1991a). Ils constituent le niveau trophique primaire (Figure I.2). Dans les niveaux supérieurs du réseau trophique (zooplancton et bactérioplancton), les organismes ingèrent l'énergie et les molécules organiques accumulées en amont par le phytoplancton. Leur mort permet d'entretenir le système par la décomposition bactérienne de la matière organique en nutriments (Figure I.2). Par conséquent, toute modification intervenant au niveau du compartiment phytoplanctonique est susceptible de bouleverser la chaîne trophique.

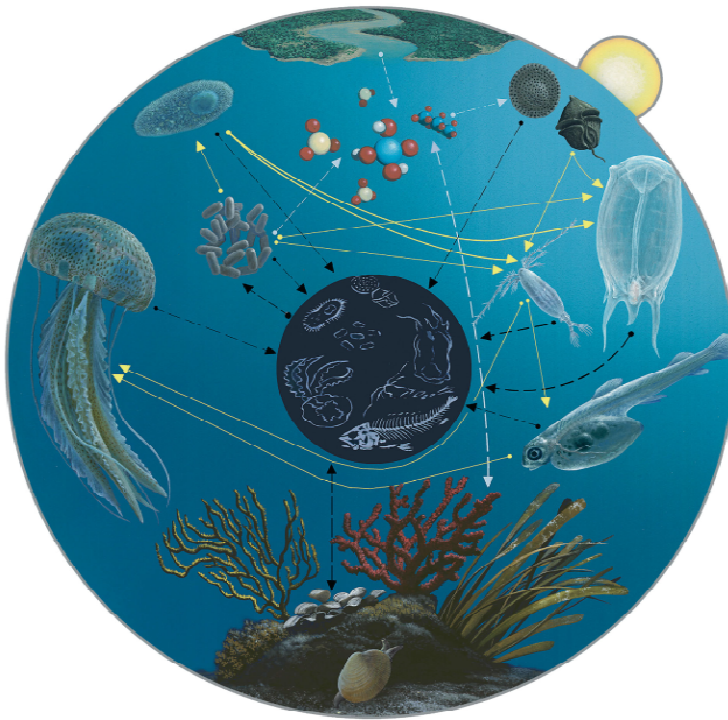


Figure 1.2. Représentation schématique du réseau trophique dans la colonne d'eau (Boero *et al.*, 2008). Les représentants des niveaux trophiques sont donnés à titre d'exemple. Les flèches blanches représentent des flux biogéochimiques, les flèches noires représentent des flux de matière organique particulaire et les flèches jaunes représentent des liens trophiques.

C'est dans cette optique que l'étude de ce compartiment (tant sur la dynamique, la diversité, la distribution et le rôle fonctionnel des espèces ou populations) est d'une importance capitale dans les recherches et les suivis écologiques des écosystèmes aquatiques (Paerl, 2000). De plus, la prolifération des populations phytoplanctoniques, sous la forme d'efflorescences (=blooms) peut être une indication concernant l'eutrophisation des systèmes aquatiques (particulièrement pour le milieu lagunaire), ce qui suscite l'intérêt tout particulier des gestionnaires, d'autant que ces phénomènes sont de plus en plus liés à des cas d'intoxication.

I.2.1. Rôles et importances écologiques

Les organismes phytoplanctoniques sont très variables en taille (allant du picomètre au micromètre ; Figure I.1) et présentent des statuts trophiques variés tels que l'autotrophie, l'hétérotrophie ou la mixotrophie. Concernant les différentes fractions de taille, il y a le microphytoplancton (e.g. Diatomophyceae) qui est efficacement broutée par le mésozooplancton (e.g. copépodes), et les nano- et picophytoplancton (e.g. flagellés autotrophes) qui sont consommés par des protistes hétérotrophes et mixotrophes (e.g. nanoflagellés de grande taille, Dinophyceae et Ciliata) ou par du macrozooplancton microphage (Frontier *et al.*, 1992). Le phytoplancton marin représente 1 à 2 % du carbone végétal total sur Terre et est à l'origine de plus de 45 % de la production primaire nette sur

notre planète (Field *et al.*, 1998). Il joue ainsi un rôle essentiel en tant que producteur primaire aussi bien dans les milieux marins que lagunaires. La plupart de la production primaire est réalisée par le microphytoplancton, constitué essentiellement de Diatomophyceae, de Dinophyceae et de Prymnesiophyceae (Miller, 2004).

La croissance du phytoplancton est limitée par différents facteurs (Cloern, 1999) ; en effet, selon l'échelle de temps des variations physico-chimiques, le phytoplancton s'adapte par des modifications des communautés ou diverses adaptations physiologiques des individus. Certaines espèces sont capables de se diviser plusieurs fois par jour (Furnas, 1991). Des efflorescences (=proliférations massives phytoplanctoniques) peuvent se produire lorsque les conditions environnementales (température, luminosité et nutriments) sont favorables (Smayda, 1997a ; Cloern, 1996). Parfois ces efflorescences peuvent être associées à des organismes producteurs de toxines (Paerl, 1988) et sont connues sous le terme *Harmful Algal Blooms* (=HAB ; Smayda, 1997b). Ce sont des phénomènes sporadiques dont la fréquence semble être en augmentation depuis quelques années et connaît une expansion inquiétante notamment dans les zones côtières. Toutefois, les connaissances actuelles montrent que seulement 5 % des espèces phytoplanctoniques sont capables de produire des toxines (Zingone & Enevoldsen, 2000) et 75 % d'entre elles, sont représentées par des Dinophyceae (Smayda, 1997b). Leur toxicité a été démontrée vis-à-vis notamment du zooplancton, des poissons et de l'homme (Beveridge *et al.*, 1993; Boon *et al.*, 1994). Le phytoplancton a également une influence majeure au sein des cycles biogéochimiques et dans le fonctionnement global des écosystèmes aquatiques (Falkowski, 1984 ; Claustre *et al.*, 1997). Par exemple, l'étude menée par Gibson *et al.* (1990) a mis en évidence que la classe des Prymnesiophyceae contribuait pour plus de 30 % au flux de sulfure sur Terre.

Depuis les années 80, de nombreux scientifiques se sont penchés sur la capacité du phytoplancton en tant que bioindicateur de la qualité des milieux aquatiques (Wu, 1984 ; Paerl *et al.*, 2003 ; Hays *et al.*, 2005 ; Leboulanger *et al.*, 2011 ; Brayner *et al.*, 2011). En effet, (i) les micro-algues sont cosmopolites, (ii) elles ont un cycle de vie court, ce qui permet le suivi de l'évolution de la taille de la population, (iii) elles sont dépendantes des conditions du milieu comme la température et les courants, ce qui induit que toute modification du milieu s'observe sur la distribution planctonique et (iv) la réponse biologique à ces changements est

non linéaire. Toutes ces caractéristiques permettent de mettre en évidence les perturbations quelles qu'elles soient, même les plus discrètes.

Malgré le rôle fondamental du phytoplancton, sa diversité est encore mal connue. Bien que les océans couvrent 71 % de la surface de la planète, la biodiversité marine a été bien moins étudiée que celle présente en milieu terrestre. Andersen (1992) souligne la difficulté d'accès et le caractère dispersif du milieu marin pélagique. Sournia *et al.* (1991b) et Norton *et al.* (1996) ont estimé à plus de 5 000 les espèces appartenant au phytoplancton, seulement pour le milieu marin. Si le nombre d'espèces décrites du phytoplancton marin apparaît faible au regard de la diversité des plantes terrestres (Briggs, 1994), de nouvelles analyses sur la diversité génétique d'assemblages naturels ont révélé une diversité insoupçonnée à différents niveaux taxinomiques (Simon *et al.*, 2009).

Des études récentes menées dans les domaines tels que la systématique, l'écologie, la physiologie et la génomique du phytoplancton ont dévoilé une diversité insoupçonnée, en particulier dans la fraction de taille picoplanctonique. Ces résultats ont des impacts majeurs sur notre compréhension de l'évolution du phytoplancton. Comprendre et évaluer la diversité phytoplanctonique, en définissant avec précision davantage d'entités taxinomiques, sera essentiel pour appréhender et prédire l'impact de l'environnement sur ce compartiment majeur.

I.2.2. Dynamique des communautés phytoplanctoniques

Rien n'est statique. Les organismes interagissent, durant leur cycle de vie, avec leur environnement (biotique et abiotique). Toutes ces activités, accomplies par les communautés, déterminent leur dynamique. La dynamique du phytoplancton étudie donc les variations d'abondance spatio-temporelle de ce dernier et les facteurs qui en sont responsables.

La production et la composition des communautés phytoplanctoniques évoluent de façon saisonnière et interannuelle (Cloern, 1996), aussi bien en milieu marin (Margalef, 1958), qu'en milieu lacustre (Amblard, 1987). Dans les écosystèmes océaniques hauturiers, la production primaire est contrôlée par différents facteurs et phénomènes physiques (e.g.

circulation des masses d'eau, upwellings, downwellings), dont les effets biologiques s'observent à différentes échelles. Le cycle saisonnier du phytoplancton est surtout contrôlé par le mélange de la colonne d'eau induite principalement par les vents (Margalef, 1958 ; Margalef, 1978). En effet, pour sa croissance, le phytoplancton a besoin d'énergie lumineuse et de nutriments, d'où l'importance de la turbulence qui brasse la colonne d'eau et permet l'importation des nutriments dans la zone euphotique. La dynamique saisonnière de production de matière organique est extrêmement variable entre les écosystèmes pélagiques, du fait de leur caractéristique locale (Longhurst, 1995).

Les écosystèmes côtiers sont soumis aux mêmes variations saisonnières que le domaine hauturier. Cependant la dynamique du phytoplancton y est plus complexe. En effet, la stabilité de la colonne d'eau est influencée par de plus nombreux facteurs, aussi bien naturels, tels que hydrodynamisme, rayonnement global, apports nutritifs, température, profondeur (Estrada *et al.*, 1999 ; Vidussi *et al.*, 2001 ; Duarte *et al.*, 2006 ; Spatharis *et al.*, 2007), qu'anthropiques comme l'eutrophisation, les contaminations toxiques, le changement climatique... (Vidal & Duarte, 2000 ; Bérard *et al.*, 2002 ; Béthoux *et al.*, 2002 ; de Jonge *et al.*, 2002 ; Goffart *et al.*, 2002). Le domaine côtier présente donc des spécificités hydrodynamiques et biologiques qui lui sont propres, puisqu'il est soumis à la fois aux influences océaniques et aux apports continentaux. Plusieurs phases apparaissent dans la succession saisonnière des communautés phytoplanctoniques. De nombreuses études mettent en évidence une floraison printanière avec un maximum de biomasse (Estrada, 1991; Delgado *et al.*, 1992 ; Estrada *et al.*, 1999 ; Ribera d'Alcala *et al.*, 2004 ; Mercado *et al.*, 2005 ; Siokou-Frangou *et al.*, 2010 ; Gohin, 2011). Sont généralement présentes dans le milieu des Diatomophyceae de grande taille avec un taux de croissance élevé comme *Chaetoceros*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* (Travers, 1971 ; Estrada *et al.*, 1999 ; Charles *et al.*, 2005). Au fur et à mesure que la stratification thermique s'établit, à travers la mise en place de la thermocline, il y a une diminution des nutriments dans la couche homotherme de surface, ce qui entraîne une diminution des biomasses (Margalef, 1985 ; Marty *et al.*, 2008 ; Lasternas *et al.*, 2011). Les Diatomophyceae de tailles inférieures aux espèces citées précédemment apparaissent et certains Dinophyceae peuvent être présents. La production primaire est beaucoup plus faible, essentiellement maintenue par l'activité bactérienne et l'excrétion zooplanctonique (Alcaraz *et al.*, 1994 ; Estrada *et al.*, 1999). La

thermocline limite le transfert des sels nutritifs en provenance des couches profondes. Les Dinophyceae dominent avec les genres *Ceratium* et *Peridiniopsis* (Pinazo *et al.*, 2001; Gomez & Gorsky, 2003) ainsi que les genres appartenant aux nano- et picophytoplancton (Barlow *et al.*, 1997 ; Marty *et al.*, 2002 ; Marty *et al.*, 2008). En automne, lors de la destruction de la thermocline, par l'effet des épisodes venteux et la baisse de la température des eaux de surface, une floraison peut se produire occasionnellement (Zingone *et al.*, 1995 ; Estrada, 1996 ; Andersen & Prieur, 2000 ; Vilicic *et al.*, 2007). Comme nous avons pu le voir, les successions phytoplanctoniques sont régies par de nombreux facteurs qui dépendent du climat, des apports nutritifs et des interactions avec les autres organismes de l'écosystème. Depuis quelques années, des dysfonctionnements au niveau des variations saisonnières des communautés phytoplanctoniques ont été observés. Ils seraient liés en particulier aux activités anthropiques (Vidal & Duarte, 2000 ; Bérard *et al.*, 2002 ; Béthoux *et al.*, 2002) et aux changements climatiques (Goffart *et al.*, 2002). De par la position du phytoplancton dans les réseaux trophiques, des conséquences écologiques et économiques majeures en découlent (Paerl, 1988 ; Sournia *et al.*, 1991a). Toutefois, il manque encore des données concernant la dynamique du phytoplancton pour progresser dans la connaissance de l'écologie générale des micro-algues et en particulier pour identifier les facteurs qui influent sur la variabilité spatio-temporelle, ainsi que sur la structure et la fonction des communautés phytoplanctoniques.

Les écosystèmes lagunaires, faisant partie des écosystèmes côtiers, se distinguent par une production primaire plus importante (Nixon, 1982 ; Costanza *et al.*, 1997). Ces milieux sont caractérisés par de faibles profondeurs et des renouvellements peu importants. Les apports du bassin versant, l'intensité des échanges avec la mer et la configuration de la lagune vont influencer leurs caractéristiques hydrologiques et notamment des paramètres tels que la salinité, la température, la lumière et la disponibilité en éléments nutritifs (Nixon, 1982). Ces éléments constituent les principaux facteurs qui influent sur la dynamique et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques (Hecky & Kilham, 1988; Ayadi *et al.*, 2004 ; Quinlan & Philips, 2006 ; Armi *et al.*, 2010 ; Drake *et al.*, 2010 ; Caric *et al.*, 2011). La présence de plusieurs successions phytoplanctoniques est le résultat de leurs tolérances vis-à-vis des paramètres physiques et de leurs compétitions pour les ressources (Margalef, 1978 ; Collos, 1986). Par exemple, l'eutrophisation en milieu lagunaire a conduit à des

altérations fortes de la biodiversité et de la structure des communautés phytoplanctoniques, avec une dominance du nano- et du picophytoplancton et un développement d'espèces toxiques dans les lagunes les plus dégradées (Collos *et al.*, 2009 ; Bec *et al.*, 2011a). Cependant, la structuration de la diversité phytoplanctonique le long d'un gradient d'eutrophisation dans les lagunes reste peu connue. L'utilisation du trait de vie et du suivi de groupes fonctionnels (Margalef, 1978), s'impose de plus en plus dans la compréhension de la structuration des communautés phytoplanctoniques le long de gradients environnementaux (Litchman *et al.*, 2007 ; Litchman & Klausmeier, 2008). En effet, la structuration des communautés phytoplanctoniques, en termes de diversité taxonomique et fonctionnelle, dépend des capacités intrinsèques des espèces à acquérir et exploiter les nutriments disponibles. Les principaux groupes phytoplanctoniques adoptent des stratégies écologiques contrastées associées à leurs traits biologiques : taille, croissance, nutrition (Margalef, 1978 ; Sommer, 1984 ; Collos, 1986). Ces stratégies adaptatives associées aux groupes fonctionnels permettent d'augmenter les capacités de résilience des communautés face aux changements de l'écosystème (Elliott *et al.*, 2007). La qualité des milieux lagunaires est une condition indispensable à l'exercice des activités de production qui s'y déroulent (e.g. pêche, conchyliculture, pisciculture), ainsi qu'à leur préservation en tant qu'habitats naturels. Dans un objectif de maintien de la qualité de ces écosystèmes lagunaires, des efforts de gestion ont été mis en œuvre depuis quelques années notamment pour réduire drastiquement les apports nutritifs des bassins versants. Or, si les processus de l'eutrophisation et son impact sur la qualité et le fonctionnement écologique des lagunes sont bien connus, les processus inverses de restauration dans ces systèmes de transition ont été peu observés. Les écosystèmes ayant subi de fortes perturbations durant plusieurs dizaines d'années et engagés intentionnellement dans un processus de restauration ne retournent pas à leur état d'origine (Elliott *et al.*, 2007 ; Duarte *et al.*, 2009). Les trajectoires de restauration ne sont donc pas réversibles et de ce fait, les lagunes devraient s'orienter vers un nouvel état selon une trajectoire encore méconnue. L'étude de la restauration des lagunes nécessite de connaître le fonctionnement écologique, l'histoire de l'altération subie (i.e. dégradation anthropique) et l'évolution de ces systèmes. Dans ce contexte, il paraît primordial de combiner une analyse fine des données acquises, avec des études complémentaires basées sur des observations de terrain et des approches expérimentales visant à mieux comprendre les mécanismes de structuration des communautés phytoplanctoniques lors des actions de

gestion. Des systèmes expérimentaux (e.g. microcosmes), dans lesquels une ou plusieurs variables (e.g. contaminants, nutriments) peuvent être contrôlées, s'avèrent très utiles pour des évaluations à caractère prédictif (Solomon & Sibley, 2002). La mise en évidence d'éventuels effets de ces variables dépend également des méthodes analytiques qui seront appliquées à la communauté phytoplanctonique. Les principales méthodes d'analyse appliquées aux communautés naturelles, et détaillées tout au long du présent travail de recherche, sont décrites dans la partie suivante.

I.3. Approches des méthodes d'analyse appliquées au phytoplancton

Face au degré de complexité des réponses des communautés phytoplanctoniques, les méthodes d'échantillonnage et d'analyse sont souvent insuffisantes. Cependant, le développement des techniques de prélèvement et d'observation ont permis d'améliorer les connaissances et de développer de nouvelles études sur le phytoplancton. Nous verrons à travers les prochains paragraphes comment à partir de l'évolution des techniques depuis les années 30, les études concernant la structure et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques ont progressé.

I.3.1. Mesures de la structure

Depuis plus d'un siècle, les études réalisées sur la structure des communautés micro- et nanophytoplanctoniques ne peuvent s'affranchir des analyses taxonomiques effectuées par microscopie. À partir des années 30, cette technique a été améliorée et pérennisée notamment par la mise en place de la méthode de sédimentation (Utermöhl, 1931 ; 1936) grâce à l'utilisation d'un microscope optique inversé. C'est l'analyse la plus fréquemment rencontrée dans la littérature. Le principe de cette méthode consiste à fixer l'échantillon et à le laisser sédimenter dans une cuve à sédimentation durant un temps spécifique en fonction de l'agent fixateur utilisé. Deux principaux types de fixateur peuvent être utilisés selon la méthode d'observation souhaitée et les organismes observés : le lugol et le formaldéhyde. Les avantages de la fixation au lugol peuvent être : (i) une pénétration plus rapide dans les cellules par rapport au formol, ce qui permet de mieux conserver les organismes sensibles au stress dans l'échantillon ; (ii) le poids spécifique des organismes qui augmente avec l'iode, ce qui entraîne des temps de sédimentation plus courts ; (iii) la détection des cellules de phytoplancton facilitée par l'augmentation du contraste entre les organismes et les liquides

environnant ; (iv) une coloration de l'amidon ce qui permet la reconnaissance des groupes d'algues qui utilisent l'amidon comme composé de stockage. Les inconvénients : (i) la coloration intense peut occulter certaines structures cellulaires devant être observées pour une identification correcte ; (ii) parfois, certaines structures cellulaires peuvent disparaître en 1 an ; (iii) la désintégration de certaines colonies ; (iv) la matière organique non fixée et les matériaux mous peuvent perdre leur structure caractéristique pendant le stockage de l'échantillon, cette altération peut être évitée en ajoutant du formol ; (v) l'auto-fluorescence de la chlorophylle *a* (Chl *a*) n'est pas détectable après la conservation dans la solution lugolée. Concernant les avantages de la fixation au formaldéhyde : (i) un bon agent de fixation et de conservation pour les algues possédant une paroi cellulaire plus rigide ; (ii) les structures de la paroi cellulaire et d'autres caractéristiques telles que les ponctuations restent visibles ; (iii) lorsque les échantillons sont correctement stockés dans des flacons appropriés, ils se conservent pendant plusieurs années sans exiger d'attention particulière ; (iv) l'auto-fluorescence de la Chl *a*, bien que cette dernière se décompose, reste intacte pendant au moins plusieurs jours si les échantillons sont stockés en continu à l'obscurité. Les inconvénients : (i) le formol peut déclencher des allergies ou des cancers chez l'homme; (ii) certaines algues peuvent être déformées ou peuvent ne pas être récupérées du tout dans l'échantillon; (iii) les organismes peuvent rétrécir, ce qui entraîne une diminution des volumes cellulaires et des biomasses calculées. D'après Sournia (1986), la fixation des micro-algues au formol est neutre, quant au lugol, il a tendance à être délaissé car il obscurcit et peut déformer les cellules.

Pour des besoins spécifiques d'autres méthodes microscopiques sont utilisées, comme la Microscopie Électronique à Balayage (MEB) depuis les années 60. Elle permet de mettre en évidence des aspects ultra-structuraux et des micro-structures chez certaines micro-algues (Couté & Tell, 1981 ; Couté, 1982 ; Couté & Franceschini, 1998 ; Chomérat & Couté, 2008). La morphologie est le caractère souvent primordial pour l'identification et la description de certaines espèces phytoplanctoniques. Le MEB apparaît donc rapidement comme l'instrument fondamental pour l'étude de ces micro-algues (Couté, 2002). À la fin des années 70, le développement de nouvelles techniques d'observation comme la microscopie à épifluorescence a révélé l'existence et l'importance d'organismes procaryotes et eucaryotes photosynthétiques de taille picoplanctonique dans les écosystèmes

océaniques et côtiers. Cependant, toutes ces analyses par microscopie font appel à des spécialistes de la taxonomie et demandent de nombreuses heures de travail par échantillon. Les scientifiques se sont alors tournés vers d'autres méthodes plus rapides et automatisées.

Depuis la première chromatographie effectuée par Tswett, botaniste russe, en 1906, cette technique n'a cessé d'évoluer. Que ce soit en chromatographie sur couche mince, par les travaux de Jeffrey *et al.* (1997), qui ont développé des méthodes ayant pour but de séparer les pigments photosynthétiques, ou par l'utilisation de la méthode par Chromatographie Liquide Haute Pression (HPLC) dans les années 80, avec des systèmes en phase inverse ou normale. Cette dernière rend possible les premières études à grande échelle sur les communautés phytoplanctoniques (Jeffrey *et al.*, 1999). Les améliorations dans la résolution des pics pigmentaires (remplacement des colonnes C18 par des colonnes C8 ; Goericke & Repeta, 1993) et la découverte de nouveaux pigments n'ont pas cessé d'évoluer. C'est en 1996 que Vidussi *et al.* développent une méthode qui permet de résoudre quelques problèmes et réduit le temps d'analyse à seulement 20 minutes. Aujourd'hui, l'HPLC et les différentes méthodes mises au point permettent de séparer, d'identifier et de quantifier avec une grande précision une soixantaine de chlorophylles, caroténoïdes et produits de dégradation. Cette technique est devenue l'outil par excellence dans l'identification et la quantification des pigments. Cependant, l'acquisition des résultats n'est pas instantanée et peut s'avérer très coûteuse.

La fluorimétrie est également une méthode fréquemment utilisée en écologie aquatique car elle est sensible, rapide, peu coûteuse et facile d'utilisation. Cette technique analytique identifie et caractérise un ou plusieurs pigments photosynthétiques. Parmi les différentes techniques de fluorimétrie *in situ*, on peut citer la FluoroProbe. La sonde FluoroProbe (bbe, Moldaenke) a été développée pour faciliter la détection et la quantification du phytoplancton le long de la colonne d'eau (Beutler *et al.*, 2002 ; Gregor & Marsálek, 2004). Depuis 2002, ce spectrofluorimètre de terrain immergeable a été mis à la disposition des scientifiques et des gestionnaires afin de quantifier la biomasse phytoplanctonique, équivalent au taux de Chl a , et de différencier plusieurs groupes spectraux phytoplanctoniques *in vivo* et *in situ* le long de profils verticaux pouvant atteindre 100 mètres. Le principe de mesure repose sur les capacités de fluorescence du

phytoplancton (Beutler *et al.*, 2002). L'émission de fluorescence fait suite à une excitation préalable par 5 diodes qui différencient les algues vertes (Chlorophyceae) à 450 nm, les algues brunes (Diatomophyceae, Dinophyceae, Chrysophyceae) à 525 nm, les algues rouges (Cryptophyceae et Cyanophyceae riches en phycoérythrine) à 570 nm et les algues bleues-vertes (Cyanophyceae riches en phycocyanine) à 590 et 610 nm (Leboulanger *et al.*, 2002). Cette discrimination de différents groupes phytoplanctoniques se fait donc sur la base de leurs caractéristiques pigmentaires propres. Une diode supplémentaire de longueur d'onde d'excitation 370 nm mesure la fluorescence de la matière organique dissoute appelée substances jaunes. L'utilisation de la FluoroProbe est prometteuse (See *et al.* 2005) mais doit encore faire l'objet de nombreux développements, particulièrement en zones côtières où les calibrations peuvent être complexes. De plus, l'étude de la composition pigmentaire ne permet pas de distinguer les groupes taxinomiques au-delà de la classe et la quantification de la contribution de chaque classe à la Chl *a* totale dépend du contenu pigmentaire, qui est variable selon les espèces d'un même taxon et selon les conditions environnementales (Jeffrey *et al.*, 1999).

Au début des années 90, une technique utilisée en milieu hospitalier, la cytométrie en flux, bouscule l'étude du phytoplancton et les connaissances du milieu océanique (Dubelaar *et al.*, 1989 ; Vaulot *et al.*, 1989). En effet, cette méthode a permis de détecter un genre appartenant au picophytoplancton (*Prochlorococcus*, Cyanophyceae ; Chisholm *et al.*, 1988). Des études plus poussées effectuées après cette découverte ont montré que dans les zones oligotrophes océaniques, la densité des Cyanophyceae et des picoeucaryotes pouvaient atteindre 10^4 à 10^5 cell.mL⁻¹ (Campbell *et al.*, 1994). La technique développée par cytométrie en flux permet de compter une à une des cellules en suspension et de mesurer simultanément les différentes caractéristiques de chaque cellule dénombrée. Celles-ci sont mesurées à partir des signaux de fluorescence liés à leurs caractéristiques pigmentaires et de leur diffraction lumineuse du fait de leur taille (Marie *et al.*, 1999). Cette autofluorescence des cellules permet leur analyse en cytométrie en flux, directement sur des échantillons frais ou après fixation et conservation adéquates (Vaulot *et al.*, 1989). La cytométrie assure donc une quantification rapide et de haute précision du picophytoplancton. Elle est donc intéressante pour l'analyse de microorganismes de taille inférieure à 50 µm (Marie *et al.*

1997 ; Collier & Campbell, 1999). Toutefois, ces caractéristiques, inhérentes à la cytométrie en flux, apportent une vision biaisée des communautés phytoplanctoniques.

I.3.2. Mesures de la fonction

Depuis le début du siècle, les méthodes permettant l'identification et la quantification des pigments chlorophylliens n'ont cessé d'évoluer. En océanographie, le calcul des concentrations en Chl *a* est principalement utilisé comme un équivalent de la biomasse phytoplanctonique. Cette méthode a été généralisée par toute la communauté scientifique depuis presque 50 ans. Cependant certains auteurs considèrent que ce paramètre n'est pas représentatif de la biomasse. En effet, le contenu cellulaire en Chl *a* peut varier entre les espèces, mais aussi en fonction des conditions nutritives et de l'éclairage (Goericke & Montoya, 1998 ; Jeffrey *et al.*, 1999 ; Schlüter *et al.*, 2000). La mesure de la Chl *a* repose sur ses caractéristiques spectroscopiques : absorption de la lumière (spectrophotométrie) ou fluorescence (fluorimétrie). La fluorimétrie présente plus d'avantages que la spectrophotométrie. En effet, c'est une méthode d'analyse plus sensible, recommandée pour les zones oligotrophes (Aminot & Kérouel, 2004) et facile d'emploi. La fluorimétrie peut être appliquée aussi bien *in situ* qu'*in vivo*. Elle fournit une information instantanée, voire continue, de la biomasse phytoplanctonique. Elle apparaît donc comme un outil indispensable pour suivre l'évolution du phytoplancton lors de certaines expérimentations (Bérard *et al.*, 1999a,b ; Bérard & Benninghoff, 2001 ; Seguin *et al.*, 2001 ; Bérard *et al.*, 2003).

La fluorimétrie PAM (*Pulse Amplitude Modulated*) initialement développée pour l'étude de la photosynthèse dans le domaine terrestre, repose sur la mesure du rendement de fluorescence des organismes végétaux (Schreiber *et al.*, 1986 ; Bolhàr-Nordenkamp *et al.*, 1989 ; Genty *et al.*, 1989). Elle présente l'avantage d'être non intrusive et non destructrice. Elle permet d'estimer les biomasses phytoplanctoniques et d'en caractériser l'efficacité photosynthétique potentielle par la mise en œuvre de séquences d'éclairements rapides (Schreiber, 2004 ; Jakob *et al.*, 2005). Les variations du rendement de la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique (photosynthèse) rendent compte de l'éventuelle altération des communautés phytoplanctoniques. Ce paramètre est particulièrement intéressant à exploiter pour évaluer les impacts de différents facteurs de stress

environnementaux comme la limitation en nutriments ou encore en cas de contamination par des polluants (Parkhill *et al.*, 2001 ; Juneau *et al.*, 2002 ; Dorigo *et al.*, 2004 ; Goto *et al.*, 2008 ; Schmitt-Jansen & Altenburger, 2008 ; Leboulanger *et al.*, 2009).

Il faut garder à l'esprit que toutes ces méthodes analytiques pour la mesure de la structure et de la fonction présentent quelques limites. Certaines n'en sont encore qu'à leurs prémices concernant le suivi du phytoplancton, aussi bien en milieu marin que lagunaire et nécessitent d'être encore améliorées avant de pouvoir être envisagées, par exemple, comme technique de routine pour les gestionnaires.

I.4. Contexte des zones côtières en Méditerranée

La Méditerranée, dont la superficie ne représente que 0,8 % de la surface des eaux marines de la planète, abrite plus de 8 % de la biodiversité marine, avec un fort pourcentage d'espèces rares et/ou endémiques (Myers *et al.*, 2000 ; Lloret, 2010). Elle est considérée comme le milieu marin le plus complexe à l'échelle planétaire, ceci en raison de la variété des processus physiques qui s'y produisent (Williams, 1998). C'est une mer semi-fermée avec un plateau continental étroit. Les fonds de moins de 50 mètres ne représentent que 5 % environ de sa surface. Les précipitations peu importantes et la quantité relativement faible d'eau douce apportée par les fleuves, ainsi que l'évaporation importante induisent un bilan hydrique déficitaire (Béthoux, 1979 ; Béthoux *et al.*, 1992 ; Roether *et al.*, 1996). Ceci se traduit par un taux de salinité et des températures d'eau élevés (Béthoux & Gentili, 1996 ; Béthoux *et al.*, 1999). Les faibles concentrations en nutriments, notamment en phosphore (Berland *et al.*, 1980 ; Béthoux *et al.*, 1992 ; Siokou-Frangou *et al.*, 2010) et en Chl *a*, classent le bassin méditerranéen comme mer oligotrophique à ultraoligotrophique (Krom *et al.*, 1991 ; Antoine *et al.*, 1995). Ces nombreuses caractéristiques notoires font d'elle une mer fragile possédant un fort intérêt écologique et un site d'étude privilégié. Elle est comparable à un « mini-océan » qui répond plus rapidement aux changements environnementaux pouvant ainsi servir, dans une certaine mesure, à prévoir l'évolution des systèmes océaniques (Béthoux *et al.*, 1999 ; Crise *et al.*, 1999).

Le littoral est représenté par une mosaïque d'écosystèmes terrestres et aquatiques. C'est par conséquent un espace d'une grande richesse écologique, mais aussi d'une grande

fragilité qui est soumis à de nombreuses pressions (Costanza *et al.*, 1997 ; Barbier *et al.*, 2011). De tous les écosystèmes présents en Méditerranée, les zones littorales subissent les conséquences les plus néfastes des actions anthropiques telles que : la pollution, l'eutrophisation, la surexploitation des ressources, la forte croissance démographique, le transport maritime dense, et ce d'autant plus dans un contexte de changement global (Lotze *et al.*, 2006, Worm *et al.*, 2006, Halpern *et al.*, 2008). Ces pressions entraînent des altérations de la biodiversité et des dysfonctionnements dans la structure et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques. Les effets, à terme, pourraient devenir irrémediables : dégradation de la qualité des eaux, fragmentation des habitats, diminution des stocks, modification des écosystèmes.

Le «Sommet de la Terre» à Rio de Janeiro, en 1992, avait permis d'identifier les zones côtières parmi les thématiques prioritaires pour la mise en œuvre d'une politique de développement durable. Cette priorité a été confirmée lors du Sommet mondial sur le développement durable» à Johannesburg en 2002. Le Plan Bleu, en sa qualité d'observatoire de l'environnement et du développement durable en Méditerranée au sein du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) / Plan d'Action pour la Méditerranée (PAM), a pris en compte également les écosystèmes littoraux et ses ressources comme une problématique prioritaire de développement durable. De plus, dans le cadre des Directives Cadres « Eau » (DCE) et « Stratégie pour le milieu Marin » (DCSMM) de l'Union Européenne, qui visent à améliorer l'état écologique des masses d'eau continentale et marine, la mise en place et le suivi d'indicateurs écologiques standardisés sont demandés de manière à effectuer l'évaluation des différents compartiments de ces écosystèmes côtiers.

Un indicateur est généralement composé de plusieurs indices permettant d'évaluer un élément de qualité. Qu'il s'agisse du phytoplancton, des macrophytes, des invertébrés ou des poissons, les indicateurs biologiques ou bio-indicateurs sont basés sur le même principe. Ce doit être « un organisme ou un ensemble d'organismes qui - par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques - permet, de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées » (Blandin, 1986). Sur la base de la sensibilité du phytoplancton, la DCE a retenu un indicateur

« Phytoplancton » pour contribuer à caractériser l'état écologique des masses d'eau. Il est composé de trois indices : la biomasse, l'abondance et la composition (Soudant & Belin, 2010). Cet indicateur doit intégrer les différences marquées et les fortes spécificités régionales (Foden *et al.*, 2010), qui s'expriment en termes de diversité, d'abondance relative des espèces, de classe de taille et de succession saisonnière. Construit initialement sur une base scientifique robuste, l'indicateur doit ensuite être simplifié pour être opérationnel et facilement utilisable par les gestionnaires. Cette simplification implique une connaissance approfondie du fonctionnement des zones étudiées et de leurs caractéristiques (OSPAR, 2008).

I.5. Approche et orientation de la thèse

Comprendre le fonctionnement et observer les dysfonctionnements d'un écosystème passent par l'étude de la variabilité des compartiments qui le composent. Dans cette thèse, il s'agit d'analyser le compartiment phytoplanctonique en terme de structure, de biomasse et d'efficacité photosynthétique, aux échelles d'observation les plus pertinentes et en fonction des paramètres biologiques et physico-chimiques contrôlant ces variations.

Dans le milieu naturel, les organismes vivants, dont fait partie le phytoplancton, ne sont jamais stables. Ils accomplissent un cycle de vie, durant lequel ils interagissent avec leur environnement (biotique et abiotique). Toutes ces activités, accomplies par des individus formant une population, déterminent sa dynamique, c'est à dire qu'elles décrivent la croissance, la diminution ou la stabilité de la population, ainsi que les modifications de sa structure. Cette dynamique étudie donc, d'un point de vue quantitatif, les variations d'abondances spatio-temporelles des populations et les facteurs qui en sont responsables. Pour les organismes unicellulaires, d'autres paramètres (quantitatif et/ou qualitatif) comme la taille ou la fluorescence pigmentaire des cellules peuvent servir de descripteurs. Le phytoplancton est constitué d'une grande diversité d'organismes dont la dynamique reste encore mal connue en raison de problèmes liés aux méthodes d'observation.

Le premier objectif de ces travaux de recherche est donc de poursuivre les efforts engagés depuis plusieurs années et qui concernent l'amélioration de méthodes d'analyse spectrofluorimétriques nécessaires pour l'étude de la dynamique et l'analyse fonctionnelle

des communautés phytoplanctoniques, mais également d'affiner les limites de ces méthodes (**Chapitre III** et **Chapitre IV**).

- Dans un premier temps, nous avons étudié les effets des conditions de conservation (température et durée) sur les paramètres photosynthétiques mesurés à l'aide du Phyto-PAM sur des échantillons de communautés phytoplanctoniques naturelles différentes. L'objectif est de définir des recommandations génériques qui régissent les procédures méthodologiques, en particulier lorsque la technique PAM est appliquée dans des conditions très chaudes (**Chapitre III**).
- Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de la FluoroProbe en zones côtières méditerranéennes. De nombreuses interrogations fondamentales et pratiques ont été abordées : un outil unique permet-il d'appréhender de manière simple et efficace le suivi du phytoplancton par les gestionnaires ? Les méthodes *in situ* peuvent-elles remplacer les méthodes classiques de laboratoire, comme l'HPLC ou la microscopie ? Quels types d'informations ces différentes méthodes fournissent-elles ? L'objectif est de trouver des pistes intéressantes à développer pour les gestionnaires dans le cadre de suivis intensifs avec comme outil principal la FluoroProbe (**Chapitre IV**).

À l'échelle de l'individu, le phytoplancton possède un important potentiel d'adaptation qui en fait un bon bio-indicateur. Il apparaît donc important d'ajuster les études sur cette diversité phytoplanctonique. De plus, la variabilité du phytoplancton s'exprime à différentes échelles temporelles (i.e. journalière à interannuelle), mais également spatiales (e.g. spécificités locales). Une mesure ponctuelle ne peut en aucun cas rendre compte de l'étendue des variations phytoplanctoniques, mais elle participe à l'amélioration des connaissances dans ce domaine. Ainsi, les scientifiques peuvent mettre en œuvre différentes stratégies d'échantillonnage, qu'ils pourront adopter en fonction des problématiques et de l'objectif de l'étude.

Le second objectif de cette thèse a pour but d'enrichir les connaissances sur la dynamique et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques à l'échelle des zones côtières en Méditerranée. Ceci à travers deux études : une étude portant sur la comparaison de la structure des peuplements phytoplanctoniques et leur succession

écologique dans deux écosystèmes marins côtiers en Corse (**Chapitre V**) et une étude portant sur la structure et l'efficacité photosynthétique des communautés phytoplanctoniques naturelles dans une lagune côtière de Corse, touchée par l'augmentation des apports d'eau douce d'origine anthropique (**Chapitre VI**). La Corse constitue un site d'étude d'un grand intérêt pour la recherche scientifique dans le domaine phytoplanctonique. Ses 1047 km de côtes regorgent d'écosystèmes particulièrement dynamiques, d'une richesse biologique importante et de zones d'interfaces productives (e.g. structure frontale, milieu lagunaire). Malgré cela, il existe très peu de données concernant la dynamique de ces micro-algues, aussi bien en milieu marin côtier que lagunaire. De plus, peu de données sur l'efficacité photosynthétique des communautés phytoplanctoniques existent sur les deux domaines étudiés. Nous avons tenté de répondre à diverses interrogations :

- Est-ce que les deux écosystèmes marins côtiers en Corse, soumis à des influences hydrographiques différentes, présentent des similitudes ou des dissemblances entre eux concernant la dynamique du phytoplancton? Est-ce que les périodes hivernales et printanières sont soumises aux mêmes conditions environnementales ? Est-ce que ces variations ont une incidence sur la succession écologique des communautés phytoplanctoniques ? Ces données sont par la suite comparées avec d'autres stations étudiées à l'échelle de la Méditerranée occidentale (**Chapitre V**).
- Quels sont les facteurs environnementaux susceptibles de contrôler la dynamique du phytoplancton dans une lagune méditerranéenne anthropisée (Biguglia, Corse)? Est-ce que la gestion des flux hydrologiques dans les milieux lagunaires peu profonds peut constituer une stratégie visant à atténuer l'eutrophisation de ces milieux? Les flux hydrologiques induisant des variations dramatiques de la salinité, est-ce que ces variations ont un impact sur la structure et l'efficacité photosynthétique des communautés phytoplanctoniques? (**Chapitre VI**).

La modification des flux hydrologiques peut entraîner une remise en suspension des particules du sédiment, notamment dans les milieux lagunaires peu profonds. Dans le milieu aquatique, une grande partie des composés d'origine anthropique ou naturelle, s'adsorbe sur les particules en suspension, puis s'accumule au niveau des sédiments. C'est ainsi que les dépôts sédimentaires à l'interface des zones océaniques et continentales, constituent de

véritables filtres et réservoirs pour les contaminants connus ou non et peuvent former d'importantes sources de contamination. Afin de poursuivre les efforts engagés sur l'enrichissement des connaissances concernant la dynamique et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques à l'échelle des lagunes eutrophisées méditerranéennes, il nous est apparu indispensable de réaliser une expérimentation écotoxicologique à travers l'utilisation de microcosmes dans la lagune de Biguglia. Nous avons évalué l'impact intégré de sédiments contaminés, remis en suspension dans une lagune peu profonde, par des effets anthropiques ou naturels sur : la structure globale, le fonctionnement et les performances du phytoplancton. Notre expérimentation prend en considération la contamination chimique multiple de l'environnement (**Chapitre VII**).

La synthèse de cette thèse reprendra les apports fondamentaux, aussi bien méthodologiques que scientifiques dans une optique de gestion du milieu et discutera de certains aspects qui sont apparus opportuns et qui feront, ou pourront faire, l'objet d'éléments de perspectives de recherche (**Chapitre VIII**).

CHAPITRE II

Écosystèmes côtiers étudiés en Corse



Bien que les zones côtières ne représentent que 8 % de la surface des océans, elles jouent un rôle important dans la production biologique océanique, elles fournissent, en effet, environ 25 à 50 % du carbone organique marin. Les écosystèmes côtiers peuvent se concevoir comme des entités géomorphologiques assurant la transition entre le continent et l'océan. Par rapport au domaine océanique, les caractéristiques majeures de ces écosystèmes sont : leur faible profondeur, leur volume restreint et l'influence des apports d'eau douce.

II.1. Contexte géographique et socio-économique

La Corse se situe dans le bassin Nord occidental de la Mer Méditerranée (Figure II.1). Avec la Sardaigne, elle occupe une position méridienne délimitant la mer Tyrrhénienne. La Corse est la troisième plus grande île du bassin occidental méditerranéen avec une superficie de 8 722 km². Elle déploie 1 047 km de côtes. Suite à la rotation du bloc Corso-Sarde, la topographie de la partie immergée présente une importante dissymétrie verticale (Figure II.1). La côte Ouest de la Corse est caractérisée par l'étroitesse du plateau continental et la présence d'une succession de canyons nettement marqués qui aboutissent à un bassin situé à plus de 2 500 m de profondeur. Par contre, la côte Est possède une plaine sableuse avec une pente faiblement entaillée débouchant dans un bassin peu profond. L'isobathe 200 m est éloignée du rivage et les profondeurs dépassent rarement les 500 m. Ce qui se traduit par une côte rectiligne. Cette différence est le reflet des mouvements de plaques opposés : en extension à l'Ouest, en compression à l'Est. Au Sud, l'île est séparée de la Sardaigne par le détroit de Bonifacio, parsemé d'îlots, dont les fonds ne dépassent pas 80 m de profondeur.

La Corse, de par sa position géographique, se trouve dans un « carrefour » climatique. Elle est soumise à un climat de type méditerranéen dont les traits distinctifs sont la fréquence des sécheresses estivales, la grande luminosité du ciel et l'irrégularité des précipitations, surtout automnales mais souvent printanières et qui peuvent se révéler fréquemment subites, violentes et abondantes. Ce climat est caractérisé également par des hivers doux. Les vents sont tous orientés vers l'île, les principaux étant les vents de Sud-Ouest (Libeccio) et de Nord-Ouest (Mistral), pouvant atteindre les 200 km.h⁻¹ (Bruno *et al.*, 2001).

La répartition des cours d'eau est, elle aussi, conditionnée par la morphologie de l'île (DRAE, 1989). À l'exception des deux bassins versants importants, le Golo et le Tavignano, tous les autres couvrent moins de 500 km². La pente moyenne de ces bassins est forte et le profil des fleuves présente des tronçons distincts. Les principaux étangs de Corse, Biguglia, Diana et Urbino, se rencontrent le long de la côte orientale de l'île appelée également la plaine orientale.

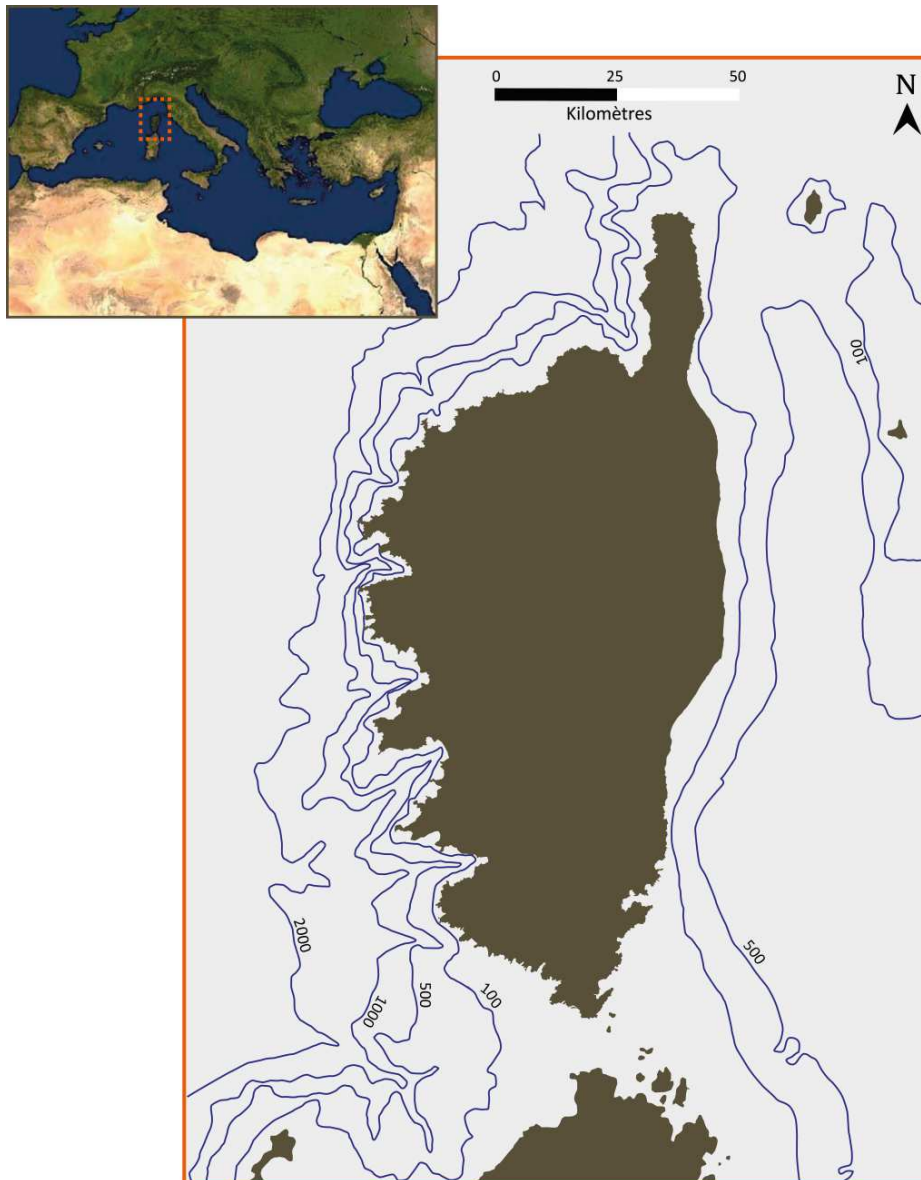


Figure II.1. Localisation de la Corse et dissymétrie verticale de sa bathymétrie. D'après la carte SHOM 7025, 1/1 000 000, Méditerranée occidentale, 1987 (photo Bassin Méditerranéen, source internet).

La Corse compte à ce jour environ 300 000 habitants sédentaires. Face à l'évolution des activités humaines, la population, auparavant localisée dans les régions montagneuses

de l'île, connaît désormais une nouvelle répartition au profit de la zone côtière. Les villes de Bastia et d'Ajaccio ont doublé leur population en 30 ans. Ce développement du littoral sur le plan économique et l'essor démographique continu sont des phénomènes enregistrés depuis quelques années. Ces événements sont accrus par les afflux touristiques importants, durant la période estivale, concentrés principalement sur le littoral. En effet, le tourisme est devenu l'une des principales activités économiques de l'île. Cette activité a entraîné une régression de certains écosystèmes et la destruction de plusieurs sites d'intérêts écologiques majeurs. Le problème des rejets en milieu marin se pose, suite à l'envahissement de l'espace urbain littoral, à l'afflux touristique estival et au développement des activités agricoles et industrielles.

II.2. Écosystème marin côtier

Le milieu marin côtier s'étend au large des terres jusqu'à la limite de la profondeur 200 m. Il présente des spécificités hydrodynamiques et biologiques propres : il est soumis à la fois aux influences océaniques et aux apports continentaux. Les conditions environnementales ne sont pas constantes, elles varient de façon périodique, saisonnière et annuelle. Les écosystèmes marins côtiers subissent des modifications permanentes des vitesses de production, de l'abondance des organismes et de la structure des communautés. Les séries à long terme des stations d'observation ont permis de voir la variation des rythmes naturels et l'impact des activités humaines. Les premières études indiquent qu'en réponse à l'augmentation régulière de l'impact anthropique, les fluctuations d'abondance et de production sont souvent soudaines et imprévisibles (Cloern, 1996).

II.2.1. Côte Ouest : la baie de Calvi

La Baie de Calvi se situe en Méditerranée occidentale sur la côte Nord-Ouest de la Corse (Figure II.2). Sa surface est de 22 km² (Bay, 1978), avec une frontière en mer ouverte d'environ 6 km. La profondeur augmente régulièrement avec une pente douce jusqu'à 100 m en bordure de la baie. Au delà, la pente est beaucoup plus forte avec la présence d'un canyon sous-marin à moins d'1 km de la frontière ouverte de la baie (Figure II.2). Deux cours d'eau se jettent dans la baie : le Fiume Secco à l'Est et la Figarella au centre. Ce sont les alluvions du Fiume Secco qui alimentent la plage de Calvi (Ozer & Comhaire, 1988).

Concernant les apports secondaires, les eaux de ruissellement jouent un rôle non négligeable (Janssens, 2000).



Figure II.2. Localisation et bathymétrie de la Baie de Calvi (d'après la carte SHOM 7050).

La structure verticale de la colonne d'eau dans la baie de Calvi, étudiée depuis une trentaine d'années, a été divisée en 2 régimes principaux (Goffart, 1992) : un régime stratifié entre mai et octobre avec des eaux plus chaudes en surface et un régime mélangé durant le reste de l'année (Norro, 1995). En régime stratifié, la profondeur moyenne de la thermocline se situe entre 25 et 35 m. Elle dépend des conditions météorologiques. En effet, la colonne d'eau subit les effets des vents dominants. Il a été observé que durant des périodes de Libeccio, la couche de mélange augmente. Par contre, en condition de vent de secteur Nord-Est, des eaux froides et riches en nutriments d'origine profonde, entrent dans la baie et remontent vers la surface (Norro, 1995).

II.2.2. Côte Est : le littoral de Bastia

La ville de Bastia se situe sur la façade maritime orientale de la Corse (Figure II.3) et se trouve au Nord de la bande sableuse formant la plaine orientale. Elle demeure soumise à des pressions anthropiques chroniques (e.g. activités touristiques, pêche, transport maritime), largement amplifiées en période estivale. La topographie est très différente de celle rencontrée dans la baie de Calvi. Cette côte est basse et sableuse. Elle est également marquée par la présence de nombreux étangs littoraux (e.g. Biguglia, Urbino, Diana, Palo) et par l'arrivée des principaux fleuves côtiers de Corse dont le Golo. La pente des fonds est très douce et la profondeur ne varie pas beaucoup.

Les vents s'apparentent à un régime de brise côtière, dont les orientations dominantes sont Sud-Ouest (Libeccio) et Sud/Sud-Ouest en fréquence (automne et hiver), et Sud/Sud-Est en intensité (été). Les vents dominants sont d'origine thermique. Ce régime de brises se forme lors des fortes variations de température observées entre la côte et la mer dans le déplacement des masses d'air (Giorgetti, *Comm. Pers.*). Pour ce qui concerne les données de courantologie de la côte orientale, le courant de dérive cyclonique, se situant au large des côtes, est d'orientation Sud-Nord (Millot, 1999). Il correspond au courant Ligure transitant entre la Corse et l'Italie et s'engouffrant ainsi dans le canal de Corse. Cependant proche de la côte, il existe un courant de dérive anticyclonique d'orientation Nord-Sud. C'est un contre-courant à la côte, induit par la côte elle-même et la bathymétrie (Gerigny, *Comm. Pers.*). La zone côtière correspondant au littoral bastiais a été choisie comme site complémentaire pour étudier la dynamique phytoplanctonique. En effet, cet écosystème présente des caractéristiques abiotiques différentes de celles de la zone côtière située dans la baie de Calvi. Il est le lieu important d'interface avec le milieu terrestre par le biais des milieux lagunaires. De plus, à notre connaissance peu d'études ont été conduites sur cette zone.

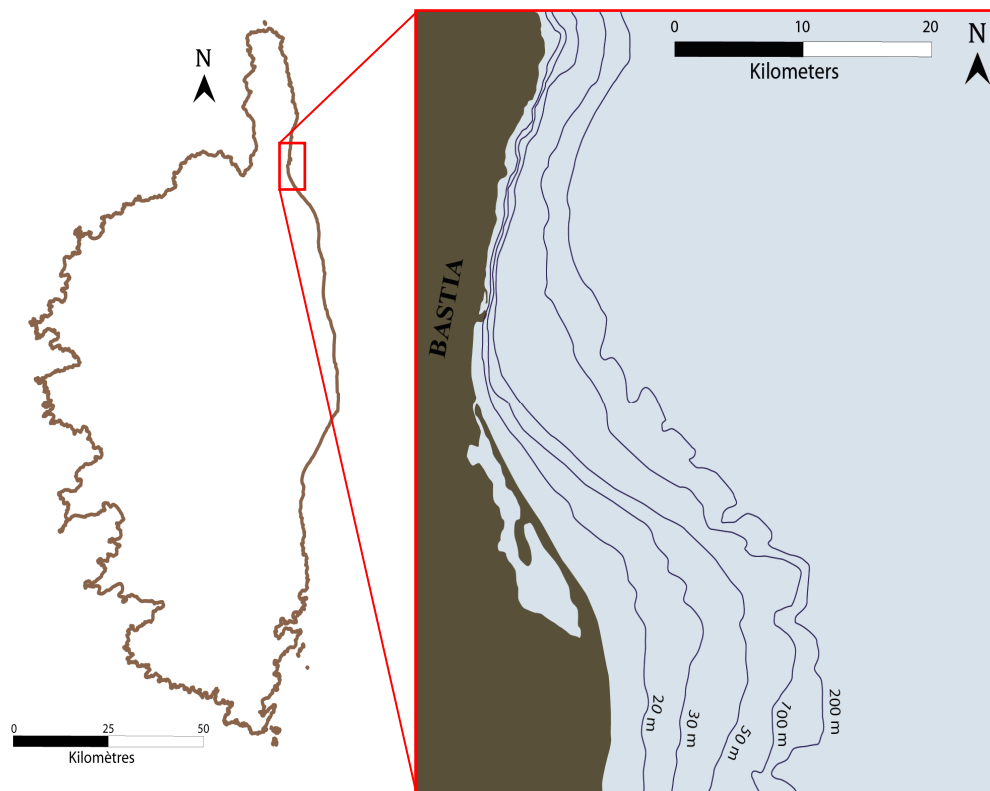


Figure II.3. Localisation et bathymétrie du littoral bastiais (d'après la carte SHOM 6822 et 6823).

II.3. Écosystème lagunaire

Les milieux lagunaires occupent 13 % du littoral mondial. Ils présentent un intérêt écologique et socio-économique tout à fait exceptionnel (Kjerfve, 1994). Situés à l'interface entre le domaine terrestre et marin, ces milieux sont caractérisés par une forte productivité (Nixon, 1982 ; Caumette *et al.*, 1996) et une diversité écologique exceptionnelle (Costanza *et al.*, 1997). Les lagunes procurent de nombreux biens et services, et assurent *in fine* le bien-être des populations humaines (Costanza *et al.* 1997, Barbier *et al.* 2011). Elles présentent une grande diversité de forme et de taille en relation avec (i) la configuration du littoral, (ii) la forme des barrières et des flèches littorales, et (iii) l'ampleur de l'érosion et des dépôts sédimentaires depuis leur formation initiale (Bird, 1982 ; 1994). Cette diversité entraîne une grande inégalité en termes de régimes thermiques et de flux hydrologiques de par les apports d'eau douce, les échanges avec la mer et les apports anthropiques (Nixon, 1982). Ayant fréquemment une profondeur n'excédant pas quelques mètres, la température est généralement homogène sur l'ensemble de la colonne d'eau. Toutefois, si la température de l'air et du vent sont favorables, une stratification thermique peut se produire et mener à des conditions anoxiques en profondeur (Souchu *et al.* 1998).

Les lagunes font partie des systèmes aquatiques les plus productifs en raison de leurs apports nutritifs, du brassage des eaux, de la proximité des sédiments et de la pénétration lumineuse (Nixon, 1982 ; Caumette *et al.*, 1996), c'est pourquoi elles soutiennent de nombreuses activités halieutiques (e.g. pêche, conchyliculture). Les écosystèmes lagunaires jouent donc un rôle important dans la transformation des nutriments azotés et phosphorés en matière organique et dans le transfert de la matière. Toutefois, elles font également partie des zones les plus vulnérables et les plus menacées par l'eutrophisation du fait de leur relatif confinement et de leur faible profondeur favorisant ce phénomène (Howarth *et al.*, 1996 ; Cloern, 2001 ; Newton et Mudge, 2005). Les causes initiales de ces perturbations sont généralement plus ou moins bien identifiées : l'eutrophisation et les pollutions organiques, les installations portuaires, l'aquaculture, la turbidité, la sursédimentation... (Giesen *et al.*, 1990; Valiela *et al.*, 1997; Bowen et Valiela, 2001; Cardoso *et al.*, 2004). De plus, en raison d'un essor démographique continu sur le littoral, les lagunes possèdent souvent des bassins versants fortement urbanisés qui tendent à apporter un excès de nutriments qui peut être à

l'origine de crises dystrophiques (Caumette *et al.*, 1996). Les influences d'eaux douces sont de différentes natures : (i) apports pluviométriques, (ii) eaux continentales superficielles (cours d'eau, ruissellement) et souterraines, (iii) canaux d'irrigation ou de navigation (Smith, 1994). Les apports marins se font principalement par les communications avec la mer (graus ou passes), et plus rarement par percolation au travers du cordon littoral sableux lorsque la différence de hauteur d'eau entre la lagune et la mer est suffisante (Bird, 1994). Le caractère temporaire ou permanent des échanges hydriques avec le milieu marin, influencés par les vents et l'amplitude des marées, confère aux eaux lagunaires, outre une salinité variable, un temps de renouvellement plus ou moins long. En effet, dans les lagunes où l'impact des marées est faible, les courants générés par le vent deviennent les principaux agents de mélange et de renouvellement des eaux (Dronkers & Zimmerman, 1982).

II.3.1. Lagune de Biguglia

La lagune de Biguglia est la plus vaste de Corse (14,5 km²) et est située au Nord-Est de l'île (Figure II.4). C'est une lagune peu profonde (profondeur maximale : 1.8 m), séparée de la mer par un cordon lagunaire sur environ 10 km de long (Figure II.4). Ce milieu reçoit des apports d'eau douce via de nombreux cours d'eau (principalement le Bevinco et le Golo par l'intermédiaire du canal du Fossone), des stations de pompage de canaux de drainage et par les événements pluvieux. Les échanges avec la mer sont limités et se réalisent grâce à un grau naturel situé à l'extrémité d'un long et étroit chenal au Nord (Figure II.4). La lagune de Biguglia est ainsi caractérisée par d'importantes variations de température (3 à 35 °C) et de salinité (4 à 37 psu) suivant un gradient Nord/Sud (Pasqualini *et al.*, 2006).

De par sa position géographique, cette lagune subit une pression anthropique importante (Frisoni & Dutrieux, 1992 ; Mouillot *et al.*, 2000 ; Orsoni *et al.*, 2001). Elle est le réceptacle d'un bassin versant urbanisé (180 km²). Cette situation amène donc une altération de la qualité de l'eau. Les apports anthropiques s'accumulent avec une possibilité de dilution réduite en mer. Ils ont pour origine les eaux de ruissellement du bassin versant (charge naturelle augmentée des apports agricoles), les rejets issus d'installations classées polluantes (caves vinicoles) ou encore les eaux usées issues de l'assainissement urbain (avec des dysfonctionnements des réseaux d'acheminement des eaux d'égout, une efficacité

médiocre de certaines stations d'épuration et une surcharge du réseau en épisodes pluvieux). La situation de la lagune de Biguglia est à cet égard préoccupante. En effet, par rapport aux 20 dernières années, où l'étang présentait un état estimé globalement sain, il a été constaté des apports accrus en éléments nutritifs source d'eutrophisation (Mouillot *et al.*, 2000 ; Orsoni *et al.*, 2001).

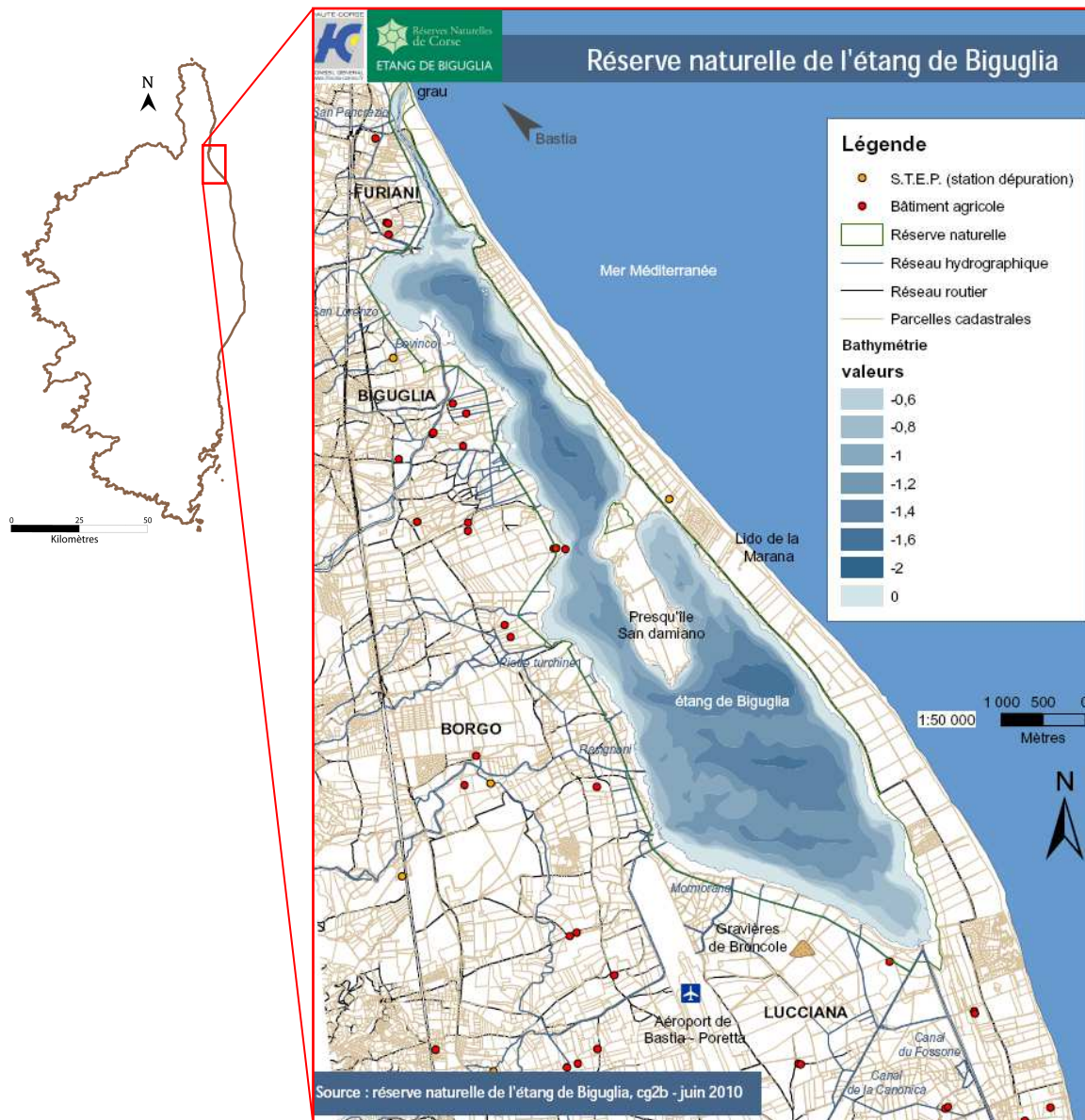


Figure II.4. Localisation et bathymétrie de la lagune de Biguglia avec la position des sites industriels, des zones urbanisées et des rivières. Agrandissement permettant la visualisation de la forme atypique de l'étang.

CHAPITRE III

Effects of samples conservation on photosynthetic efficiency assessment of phytoplankton using PAM fluorometry



Ce chapitre fait l'objet d'un article accepté (Garrido M., Cecchi P., Vaquer A., Pasqualini V.) dans *Deep Sea Research Part I*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2012.09.004>

III.1. Introduction

Chlorophyll fluorescence methods were first developed over 30 years ago to monitor and assess mechanisms of photosynthesis in phytoplankton and higher plants (Schreiber *et al.*, 1986; Bolhàr-Nordenkamp *et al.*, 1989; Genty *et al.*, 1989). Use of this technique was well justified because fluorescence measurements are closely related to photosynthetic metabolism and gas exchange measurements (Walker *et al.*, 1983; Genty *et al.*, 1989; Deblois & Juneau, 2010). Pulse Amplitude Modulated (PAM) fluorescence measurements are now widely used as a simple, fast and non-destructive method to assess physiological status in photosynthetic organisms (Krause & Weis, 1984; Schreiber *et al.*, 1994; Baker, 2008). Observed changes in PAM-fluorescence parameters are widely used in field and/or experimental investigations to study phytoplankton, particularly to assess the impacts of different environmental stressors such as nutrient limitation and contamination events (Parkhill *et al.*, 2001; Juneau *et al.*, 2002; Dorigo *et al.*, 2004; Goto *et al.*, 2008; Schmitt-Jansen & Altenburger, 2008; Leboulanger *et al.*, 2009). The high accuracy of fluorescence measurements justifies the potential of this approach for assessments of primary production in surface waters (Yentsch *et al.*, 2004; Jakob *et al.*, 2005; Schloss *et al.*, 2008; Doblin *et al.*, 2011) and explains its increasing popularity in field assessments.

The fluorescence measured by PAM is emitted by Photosystem II (PSII) pigments and reflects the efficiency of the photochemical energy conversion of PSII reaction centers (Krause & Weis, 1991; Schreiber *et al.*, 1994). The fluorescence signal induced by a non-actinic (non-photosynthetic) light source can be separated from the fluorescence induced by any actinic light, thus allowing independent determination of variable fluorescence (F_v) under background irradiance. Intrinsic fluorescence (F_o) is determined continuously, and then photochemistry is saturated by an intense light pulse during which peak fluorescence, F_m or F'_m , is determined. Parameters such as maximal PSII quantum yield, $(F_m - F_o)/F_m = F_v/F_m$, and effective PSII quantum yield $\phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m$ are useful to study photosynthetic organisms as they respectively indicate the ability of dark-adapted and light-adapted organisms to convert light energy into chemical energy (Bolhàr-Nordenkamp *et al.*, 1989; Genty *et al.*, 1989). PAM fluorometry can also measure other parameters related to

photosynthetic efficiency (quenching) and performance (photosynthetic light response curves ; see Schreiber *et al.*, 1994; Kolbowski & Schreiber, 1995; White & Critchley, 1999), the last one remaining however controversial both in terms of methodology and of interpretations (Cruz & Serôdio, 2008; Ihnken *et al.*, 2010).

The methodology used to measure PAM-fluorescence parameters is often redundant and well documented for algae. As phytoplankton are rapidly affected by changes in their environment, it is recommended to analyze their physiological properties on fresh samples and without delay after collection. However, the number of samples and analytical procedures needed to obtain valuable data is sometimes too high for immediate analysis, forcing delays between sampling and analysis that can reach several hours between the first and the last measurement sequence. This situation is regularly encountered during large-scale monitoring surveys of continental water masses implying series of samples collected from (very) scattered locations prior to in-lab analysis. Authors are regularly conducting such monitoring surveys in remote areas of Sahelian West Africa, which require the installation of rough-and-ready field lab (i.e. no air-conditioning system) to perform measurements within reasonable delays. With mean daily (air) temperatures up to 40 °C, after a few hours of measurements, the “room temperature” in the field lab often exceeds 35 °C. This raises several issues: how to store samples between collection and analysis? At what temperature? Do conservation conditions and imposed time-lags (due to the number of analyses to be performed) between sample collection and fluorescence measurements have potential cumulative effects? A preliminary assessment performed with algae collected in a tropical reservoir (*in situ* temperature close to 30 °C) has shown us that discrepancies between results after storage at 15 °C versus 45 °C can exceed 50 % (Cecchi, unpublished data).

Phytoplankton photosynthesis is well known to be modulated by natural factors such as temperature (Raven & Geider, 1988; Davison, 1991), as temperature variations can dramatically disturb the fluorescence characteristics of organisms (Krause & Weis, 1991; Falkowski & Raven, 2007) well below the threshold at which high temperature irreversibly inhibits photosynthesis (Pastenes & Horton, 1996). Temperature variations result in changes in photosynthetic electron transport activity and other processes related to photosynthesis, and will further modify the fluorescence characteristics of algae (Falkowski & Raven, 2007).

For temperate communities, strong reductions of the maximum rate of photosynthesis have been documented when temperature exceeds 30 °C (Morris & Kromkamp, 2003), although with optimal values that depend on species-of-interest (Claquin *et al.*, 2008). The temperature conditions of PAM measurements, despite their obvious potential impacts on the fluorescence properties of phytoplankton samples, are not often clearly described, except for extreme cold conditions (Kashino *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2007). Authors generally state that samples taken at *in situ* or *in vivo* temperature were stored at “room temperature”, but without giving details of this “room temperature” (Eullaffroy & Vernet, 2003; Guasch *et al.*, 2010). In some cases, no information on sample conservation is given at all (Goto *et al.*, 2008). This raises questions over the potential impacts of sample conservation, particularly if their sensitivity to other controlled stressors (e.g. contaminants) is to be assessed (see Chalifour & Juneau, 2012).

Sample storage conditions (temperature, duration) before measurement may potentially have a strong influence on their fluorescence properties. As this issue has not been formally documented, we conducted an experiment evaluating the impacts of storage conditions on the photosynthetic performances of phytoplankton samples.

The aim of our study was to investigate the effects of (i) three different conservation temperatures (15 °C, 25 °C, 35 °C) after (ii) three different conservation durations (from 2 h to 4 h – “morning”, from 6 h to 8 h – “afternoon”, and from 10 h to 12 h – “evening”, after collection) on the photosynthetic parameters of phytoplankton samples. We performed this test on a series of six very different (composition assemblages - as described *in situ* by a BBE FluoroProbe, initial physiological status) phytoplankton communities sampled in different environmental locations (depth and salinity) of Biguglia lagoon (Mediterranean Sea; Figure III.1). The fluorescence responses of these phytoplankton assemblages were evaluated using PAM fluorometry, and the relative sensitivity of PAM parameters to sample conservation was investigated. Results allowed the definition of generic recommendations governing methodological procedures, particularly when PAM methodology is applied under very warm conditions. Results allowed the definition of generic recommendations governing methodological procedures, particularly when PAM methodology is applied under very warm or tropical conditions.

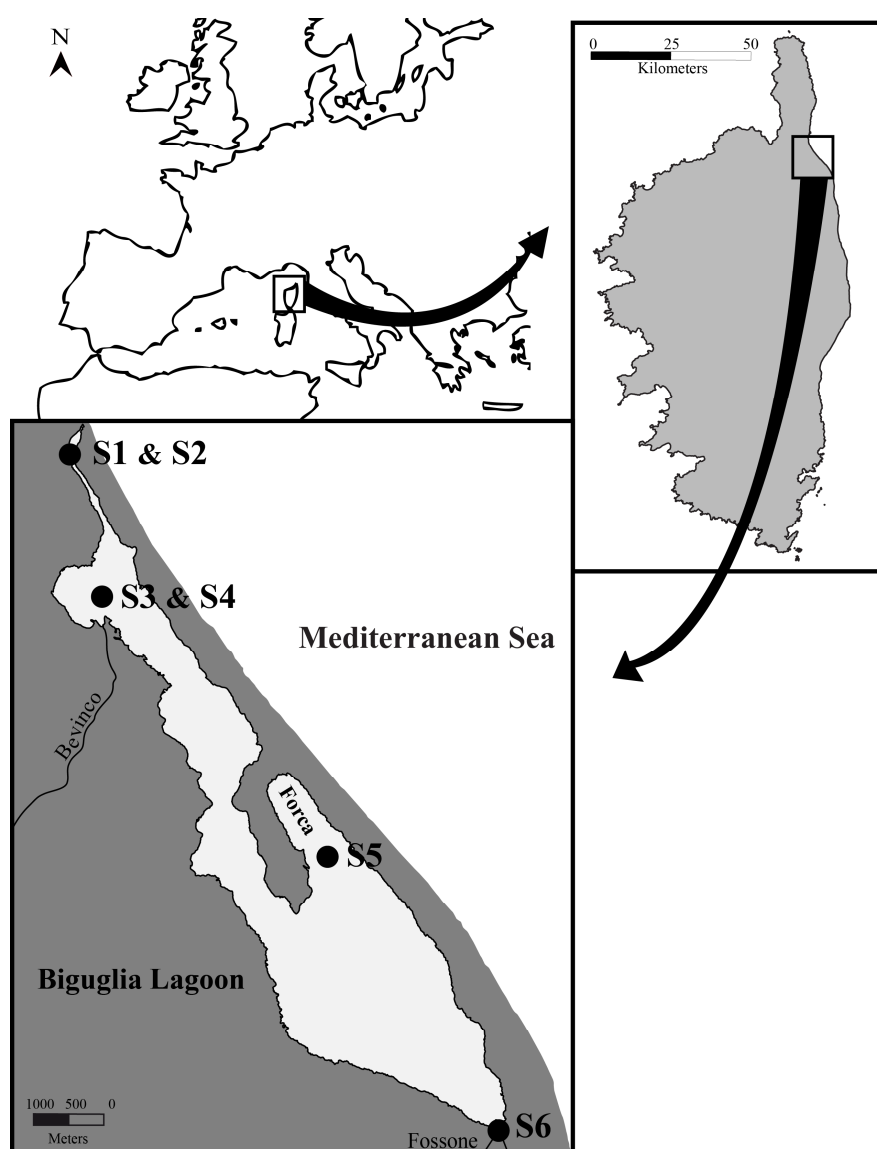


Figure III.1. Study site, showing station locations (d'après les cartes SHOM).

III.2. Materials and methods

III.2.1. Study site and sampling procedures

The study was carried out in Biguglia lagoon (Figure III.1) located along the Eastern Mediterranean coast of Corsica ($42^{\circ}36' \text{ N}$; $9^{\circ}28' \text{ E}$). Biguglia lagoon is a shallow (maximum depth: 1.8 m) brackish coastal lagoon covering 14.5 km^2 that is separated from the sea by a 10 km long sand beach. The lagoon is connected to the sea by a narrow natural channel located at its extreme north, and receives fresh water from an artificial channel situated at its extreme south as well as from a series of small rivers that drain its watershed (180 km^2).

Significant variations in salinity (4-37 psu) and temperature (3-28 °C) have been documented at various temporal and spatial scales (Pasqualini *et al.*, 2006).

A pre-sampling survey was carried out on 19 July 2010 to describe the spatial environmental heterogeneity of the lagoon and identify the different locations to be further sampled. We then collected six samples (Figure III.1) and their associated field data (two per day for three consecutive days, 21-23 July 2010, at 7:30 am (± 15 min) local time). Sub-surface samples were systematically collected (S1, S3, S5 and S6) and two deep samples were collected where the water column showed significant vertical heterogeneity (S2 and S4, see Table III.1).

Table III.1. Environmental parameters of the six sampled locations.

Locations		Grau Channel		Bevinco Cove		Forca Cove	Fossone Channel
Water column							
Depth (m)		1.55		1.40		1.20	1.40
Light attenuation coefficient (m^{-1})		-1.10		-1.35		-1.33	-1.59
Mixed layer (m)		0.40		0.50		1.20	1.40
Samples		S1	S2	S3	S4	S5	S6
Level (m)		0.20	1.30	0.20	1.30	0.20	0.25
Temperature (°C)		29.4	30.0	29.4	31.9	30.2	28.4
Salinity (psu)		25.1	36.9	11.4	28.8	4.8	14.9
Dissolved oxygen (%)		79.7	21.0	122.5	65.9	100.0	55.2
Chlorophyll <i>a</i> (μg eq Chl.L ⁻¹)		6.5	2.6	5.2	9.8	3.2	6.4
Phytoplankton composition							
Chlorophyta (%)		38.9	16.6	59.0	18.4	0.0	40.4
Cyanophyceae (%)		0.0	3.9	0.2	0.0	65.5	17.4
Diatomophyceae and Dinophyceae (%)		61.1	77.6	40.8	81.6	22.6	34.6
Cryptophyta (%)		0.0	1.9	0.0	0.0	11.9	7.6

In-field sampling locations were localized using a GPS (Garmin 45XL) receiver. Depths were measured with a handheld 0.1 m-resolution echo sounder (Plastimo Ecotest II). Vertical profiles of salinity, temperature and dissolved oxygen were performed at each station with a multiparameter Water Quality Probe (YSI Environmental Monitoring Systems, 6600 V2-2). These profiles were later used to determinate the mixed layers of the sampled water columns. Photosynthetically Active Radiation (PAR) was measured using a LiCor Li192 underwater quantum sensor at 25 cm intervals along a vertical profile to calculate light

attenuation coefficient (K_c , m^{-1}) and to evaluate the photic layer (defined as the part of the water column receiving more than 1 % of incident light). Phytoplankton assemblage structures were deduced from *in situ* BBE-Moldaenke FluoroProbe measurements (Beutler *et al.*, 2002; Leboulanger *et al.*, 2002; Gregor & Marsálek, 2004) allowing the accurate discrimination of four major classes of microalgae [green algae (Chlorophyta and Euglenophyta) rich in Chl *a* and *b*; brown xanthophyll-containing algae (Diatomophyta, Chrysophyta and Dinophyta); blue phycocyanin-rich algae (Cyanophyta) and red phycoerythrin-rich algae (Cryptophyta)] on the basis of the relative fluorescence intensity of Chl *a* at 680 nm (due to Photosystem II core pigments), following sequential light excitation by 5 light-emitting diodes (LEDs) emitting at 450, 525, 570, 590 and 610 nm. Depending on the accessory pigments of the light-harvesting complexes, and thus the phylogenetic position of the phytoplankters present in the sample (Catherine *et al.*, 2012), the system detects a set of characteristic fingerprints which are used by dedicated software to calculate the relative respective contributions of each algal class to global phytoplankton biomass (μg eq. Chl.L⁻¹).

Water samples were collected with a Niskin-like bottle (deep samples) or directly from the boat (sub-surface samples) and were immediately distributed into three different opaque 1 L flasks, after filtration on a 200 μm mesh filter to eliminate mesozooplankton and large debris. Samples were brought back to the lab and the first measurements every day were performed within two hours (± 15 min) of sample collection.

III.2.2. Experimental procedures

At the lab, samples were stored in dark chambers for a maximum of 12 h at three different temperatures (15 °C, 25 °C and 35 °C) chosen by design. 25 °C, hereafter called “*room temperature*”, corresponds to the routine temperature of air-conditioned laboratories in summer. 35 °C corresponds to an air temperature often (even daily) experienced during summer in Corsica, as well as to temperature frequently experimented in “*field labs*” in tropical conditions. 15 °C is a temperature easily reachable using an ice-box equipped with a couple of ice-packs, i.e. the most classical method of storing samples collected during limnological studies. Temperatures were controlled in the three dark chambers and monitored continuously using HOBO Water Temp Pro V2 data loggers.

For each sample, three series of fluorescence measurements were carried out using a Phyto-PAM fluorometer (from 2 h to 4 h after sampling, hereafter cited as “morning”, from 6 h to 8 h after sampling, i.e. “afternoon”, and from 10 h to 12 h after sampling, i.e. “evening”) in order to quantify the potential effects of temperature and storage duration on photosynthetic parameters. Morning PAM measurements were systematically performed first on the samples stored at 15 °C. These first measurements occurred 2 hours (± 15 min) after sample collection. This delay was incompressible and corresponded to the field trip on the lagoon followed by sample transportation back from the sampling site to our “field lab”. Due to the size of the small craft available for this experiment, it was not possible to realize PAM measurements in-field immediately after sample collection as there was no way to fit the instrument on the boat deck. One hour (3 x 20 min) was required to measure all three replicates of each treatment; it therefore took three hours to measure all nine samples. Röttgers (2007) performed lab-based measurements of photosynthetic performances on discrete phytoplankton samples that were stored at the former ambient temperature of the water sample within less than 150 minutes (2.5 hours). The author assumed that this conservation duration ensured the comparability of the several samples studied using different instruments. This is the same duration as used for our samples (i) from collection to the first morning measurements, and then (ii) from analysis of the first triplicate to the last triplicate measured in each treatment. We also assumed, as Röttgers did, that each batch of measurements (morning, afternoon, evening) corresponded to a same “mean” duration.

III.2.3. Fluorescence measurement

Photosynthetic parameters were assessed using a Phyto-PAM fluorometer and its dedicated Phyto-Win software (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The instrument was equipped with the Optical Unit ED101-US (measuring chamber) featuring a standard quartz cuvette. Samples were continuously maintained in the dark, so we did not proceed with a specific dark-adaptation period. A 2 mL sample was introduced into the measuring chamber and allowed to stabilize at modulated (non-actinic) light (ML) for a couple of minutes. The very low level of energy supplied by ML prevents reduction of the photosystem II (PSII) primary electron acceptor pool (plastoquinones, QA). The observed intrinsic fluorescence (F_0) thus represents the fluorescence when all PSII reaction centers are open and potentially

available for electron transport (i.e. photosynthesis). A short saturating pulse (SP) was then applied (wavelength peak: 655 nm; intensity: 4 000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; duration: 200 ms) to induce the maximal fluorescence yield (F_m) on dark-adapted cells by triggering the reduction of all QA. Determining F_o and F_m makes it possible to evaluate the variable fluorescence, $F_v = F_m - F_o$, and allows the calculation of the maximum efficiency of photosystem II, F_v/F_m (Kitajima & Butler 1975, Bolhàr-Nordenkamp *et al.* 1989). The F_v/F_m ratio is related to the potential (maximum) photochemical efficiency of PSII and indicates the fraction of the absorbed energy channeled to photosynthesis by PSII reaction centers.

The sample was then exposed to actinic light (AL) for 190 s, and five consecutive saturating pulses SP were applied at 30 s intervals, the first after 60 s of exposure; (Perkins *et al.*, 2006). AL intensity was adjusted to $\approx 1,000 \mu\text{mol photons cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (value that corresponded to the *in situ* irradiance at midday and 25 cm below the surface as observed during the pre-sampling survey). The change of the fluorescence yield (F) during the illumination by AL induced the typical Kautsky effect, whereas the application of periodic SP every 30 s makes it possible to measure changes in maximal fluorescence yield (F'_m). At the steady state of electron transport under AL, effective quantum yield, ϕPSII , was obtained by the ratio $(F'_m - F)/F'_m$ (Genty *et al.*, 1989).

Rapid Light Curves (RLC) were obtained using the light-curve control software of the fluorometer which applies a series of 30 s exposures of gradually-increasing actinic irradiances to the sample (20 steps from 16 to 2 000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), each illumination period being followed by a Saturation Flash to measure effective quantum yield (ϕPSII). Such measurements allowed the construction of curves illustrating Electron Transport Rate (rETR) variations in PSII as a function of photon flux intensity (Ralph & Gademann, 2005). According to the approach advocated by Ralph *et al.* (2005), we graphically determined the ecophysiological parameters rETR, α and E_k :

(i) Electron transport rate,

$$\text{rETR} = \phi\text{PSII} \times \text{PAR} \times 0.84 \times 0.5$$

where PAR is incident irradiance, 0.84 is default absorption factor, 0.5 is the assumed proportion of photons absorbed by pigments associated with PSII.

(ii) Minimum saturating irradiance,

$$E_k = ETR_m / \alpha$$

where α is the initial slope of the light response curve ($\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

In the absence of photo-inhibition, the Webb *et al.* (1974) model was applied to the data, whence we deduced: ETR_m , maximal electron transport rate ($\mu\text{mol electrons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$),

(iii) Maximal light utilization efficiency, α ($\text{mol electrons mol photons m}^{-1}$)

$$\alpha = ETR_m / E_k$$

The data produced by Phyto-PAM were exported into Sigma Plot software to adjust the modeled curve. Measurements were performed in triplicates.

III.2.4. Pigment degradation

In absence of HPLC facilities, pigment contents (chlorophylls *a*, *b* and *c* and their degradation products pheopigments *a*, *b* and *c*) were measured by spectrofluorimetry. 100 mL of sample aliquots were filtered under vacuum (< 10 cm Hg) through Whatman GF/F filters (25 mm diameter) and immediately stored at -20 °C. Filters were later ground in 90 % acetone and extracted for 24 h in the dark at 4 °C. Pigment content was then spectrofluorimetrically measured (Perkin-Elmer LS50 b) and calculated according to Neveux and Lantoine (1993). Measurements were performed on freshly-collected samples (morning, before any conservation) and, in the evening, after 12 h in storage at each of the temperatures tested. Any increase in Pheo *a* / Chl *a* ratio would be interpreted as a degradation footprint of the sample.

III.2.5. Statistical analysis

All data were analyzed with two statistical softwares: Statistica 9.0 (Statsoft, Inc.) and SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc.). One-way ANOVA combined with Tukey's HSD post-hoc tests were used to compare the photosynthetic parameters (as proxy of physiological state) of the 6 freshly-collected morning samples. A non-parametric Friedman test (similar to the

parametric repeated measures ANOVA) was combined with the “post hoc” multiple range tests. Friedman’s test has been used to detect the differences potentially associated to the different treatments applied to each sample for the Fv/Fm measure, and was also used for all tests performed on the RLC parameters. The comparisons of the contribution of pheopigments to the pigmentary equipment before and after one day of storage at the different temperatures were performed using the non-parametric Wilcoxon test for paired samples (Wilcoxon’s signed-rank test).

III.3. Results

III.3.1. Environmental context

The weather remained stable and sunny during the whole study period (19-23 July 2010). Light attenuation coefficients ranged from -1.1 m^{-1} to -1.6 m^{-1} , indicating absence of PAR limitation for all the sampled stations. Two stations were completely mixed (Forca Cove, S5 and Fossone Channel, S6) where only sub-surface samples were collected. This was not the case in the Grau channel and in Bevinco Cove, with mixed layers corresponding to 25 % and 36 % of the water column, respectively (Table III.1). For these two locations, sub-surface and deep samples were thus collected (S1 and S2 in Grau channel, S3 and S4 in Bevinco Cove). Chlorophyll varied between 2.6 and $9.8 \mu\text{g eq. Chl.L}^{-1}$ and tended to increase significantly ($R^2 = 0.84$) with salinity (except S2). The contribution of Diatomophyceae and Dinophyceae significantly increased with salinity ($R^2 = 0.90$), whereas Chlorophyta showed the reverse trend. Cyanophyceae were dominant in Forca Cove (S5).

It thus appeared that these six samples, with their respective specificities, corresponded to the expected different situations.

III.3.2. Conservation conditions

Samples were stored in black thermostatic chambers for the whole duration of the experiment. Temperatures were carefully controlled and remained at the expected levels (data not shown). For the three series of experiments, the coldest temperature remained constant at $15.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (coefficient of variation, $\text{CV} = 8.4 \%$), “room temperature” was $26.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{CV} = 2.7 \%$), and the warmest temperature was $35.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{CV} = 3.3 \%$).

III.3.3. Quantum yield of photosystem II

Firstly, to document the basic differences exhibited by our 6 samples, we cross-compared their morning photosynthetic parameters. The mean F_v/F_m values varied from 0.21 (S2) to 0.61 (S4) across the stations sampled (Figure III.2). Three different types of samples were identified at the beginning of the experiment (one-way ANOVA and Tukey's HSD post-hoc test, $P < 0.001$). F_v/F_m values were lowest at S2 and highest (and not statistically different between samples) at S1, S3, S4 and S6. The maximum quantum yield of PSII of the S5 sample presented an intermediate value (0.34).

The mean F_v/F_m values showed large variations during the course of the experiment (Figure III.2), with minimal values close to zero (0.08, S2, 35 °C, evening) and maximal values close to morning values (0.63, S4, 15 °C, afternoons). At 35 °C, the F_v/F_m values decreased regularly as conservation duration increased (see letters assigned to the Friedman test values on Figure III.2), except for the two samples collected in Grau Channel (S1 and S2) which showed no significant change over the day. At 25 °C, F_v/F_m values showed a slight decrease with increasing conservation duration for samples S1, S4 and S5. The three other samples showed no significant trend. The main feature observed when samples were kept at 15 °C was the general absence of significant variations over the day. Mean values of effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}) for all samples and all treatments varied between 0.15 (S2, 35 °C, morning) and 0.63 (S4, 15 °C, evening; data not shown). The impacts of the different treatments on Φ_{PSII} values showed the same global trends as for F_v/F_m ratio values (data not shown). At 35 °C, Φ_{PSII} values decreased strongly over time for samples S3, S4, S5 and S6 (Friedman test; $P < 0.05$). At 15 °C and 25 °C, Φ_{PSII} values did not vary over time, except for S2 (with a slight increase for both temperatures), S3 (with a slight increase at 15 °C) and S5 (with a marginal decrease at 25 °C; Friedman test; $P < 0.05$).

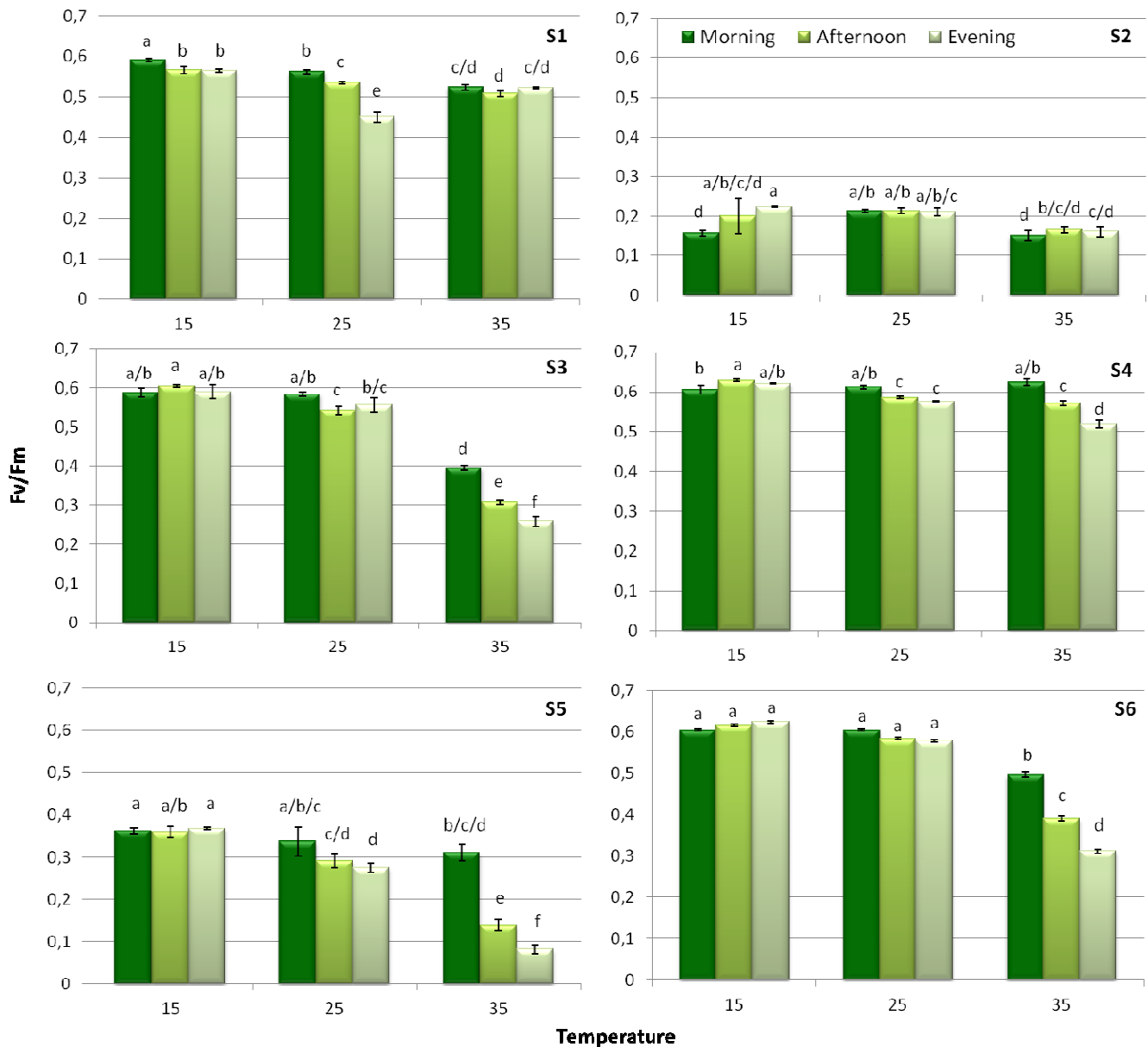


Figure III.2. Means and standard errors of the maximum quantum yield (F_v/F_m) as a function of storage temperature and time-in-storage (Friedman test: for each sample, values that did not differ at the 0.05 level were assigned the same letter).

III.3.4. Rapid light curves

The photosynthetic parameters (α , E_k and $rETR$) were graphically determined, based on rapid light curves modeled for each site and for all treatments. For the whole experiment (six samples), and depending on the treatments (temperatures and durations), the mean values of the light-limited photosynthetic efficiency (α) ranged from 0.03 mol electrons mol photons⁻¹ (S5, 35 °C, evening) to 0.26 mol electrons mol photons⁻¹ (S4, 35 °C, morning; Figure III.3). At 35°C, α systematically and regularly decreased as conservation duration

increased (see letters assigned to the Friedman test values on Figure III.3), except for the sample collected from the bottom layer of Grau Channel (S2) that exhibited the lowest initial values (≈ 0.1 mol electrons mol photons⁻¹) and where no significant change was observed over the day. No significant changes were observed at 25 °C and 15 °C, other than a slight decrease for S1 and S5 (Figure III.3).

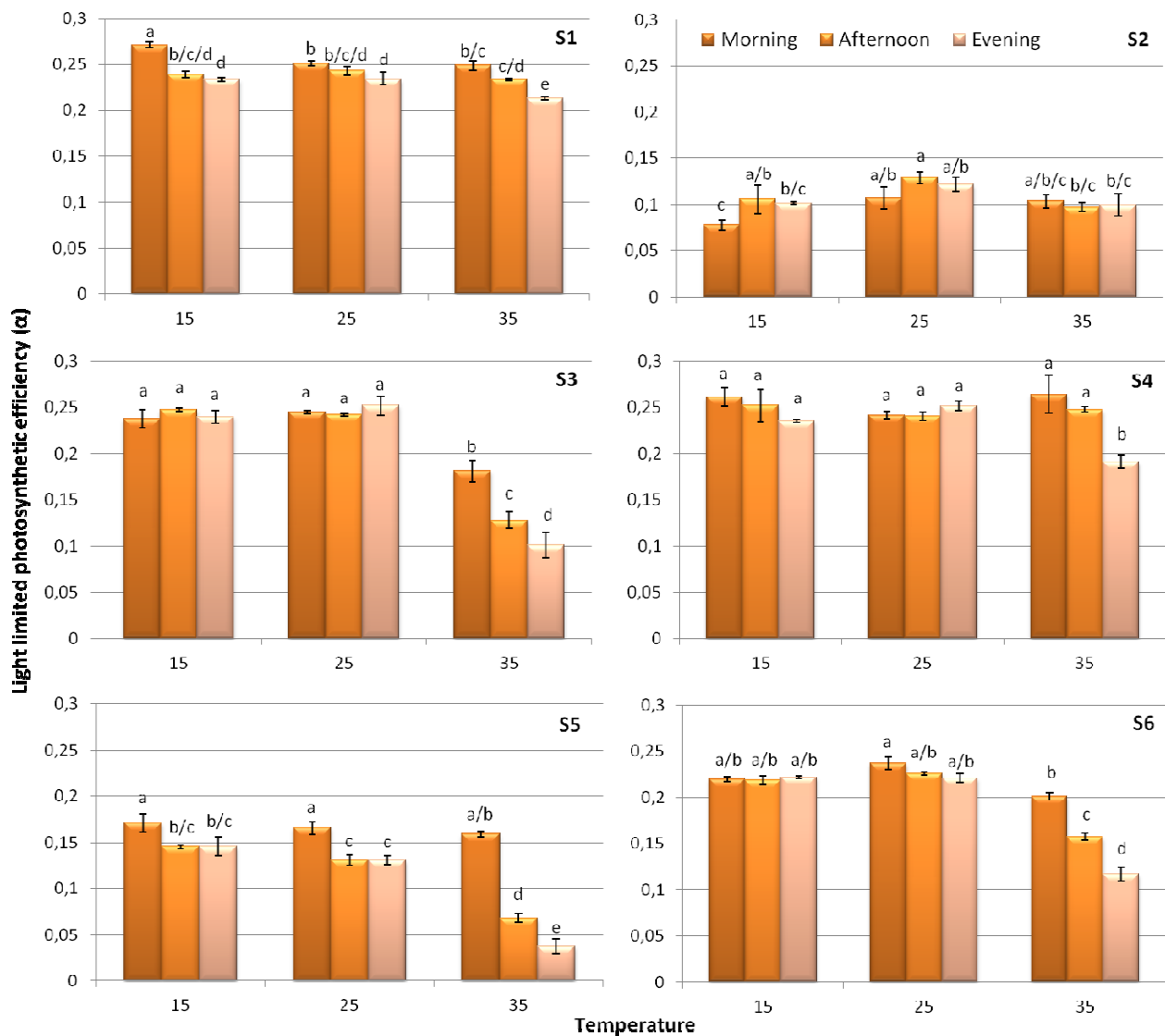


Figure III.3. Means and standard errors of light-limited photosynthetic efficiency (α , mol electron mol photon⁻¹) as a function storage temperature and time-in-storage (Friedman test: for each sample, values that did not differ at the 0.05 level were assigned the same letter).

The morning values for minimum saturating irradiance (E_k) showed large between-sample differences, and varied between ≈ 450 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (S6) and ≈ 800 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (S1). The other morning samples showed intermediate values around 600 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. No significant changes were observed whatever the conservation

temperature and conservation duration (data not shown). For the whole experiment (six samples) and depending on the treatments (temperatures and durations), mean values for maximum electron transport rate (rETR) varied between 37.6 $\mu\text{mol electrons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (S5, 35 °C, evening) and 208.5 $\mu\text{mol electrons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (S1, 25 °C, afternoon; Figure III.4). rETR values decreased strongly over the day for most samples at 35 °C, except S2 (Friedman test; $P < 0.05$) and to a lesser extent S1, whereas there was no significant change at 15 °C and 25 °C (Figure III.4).

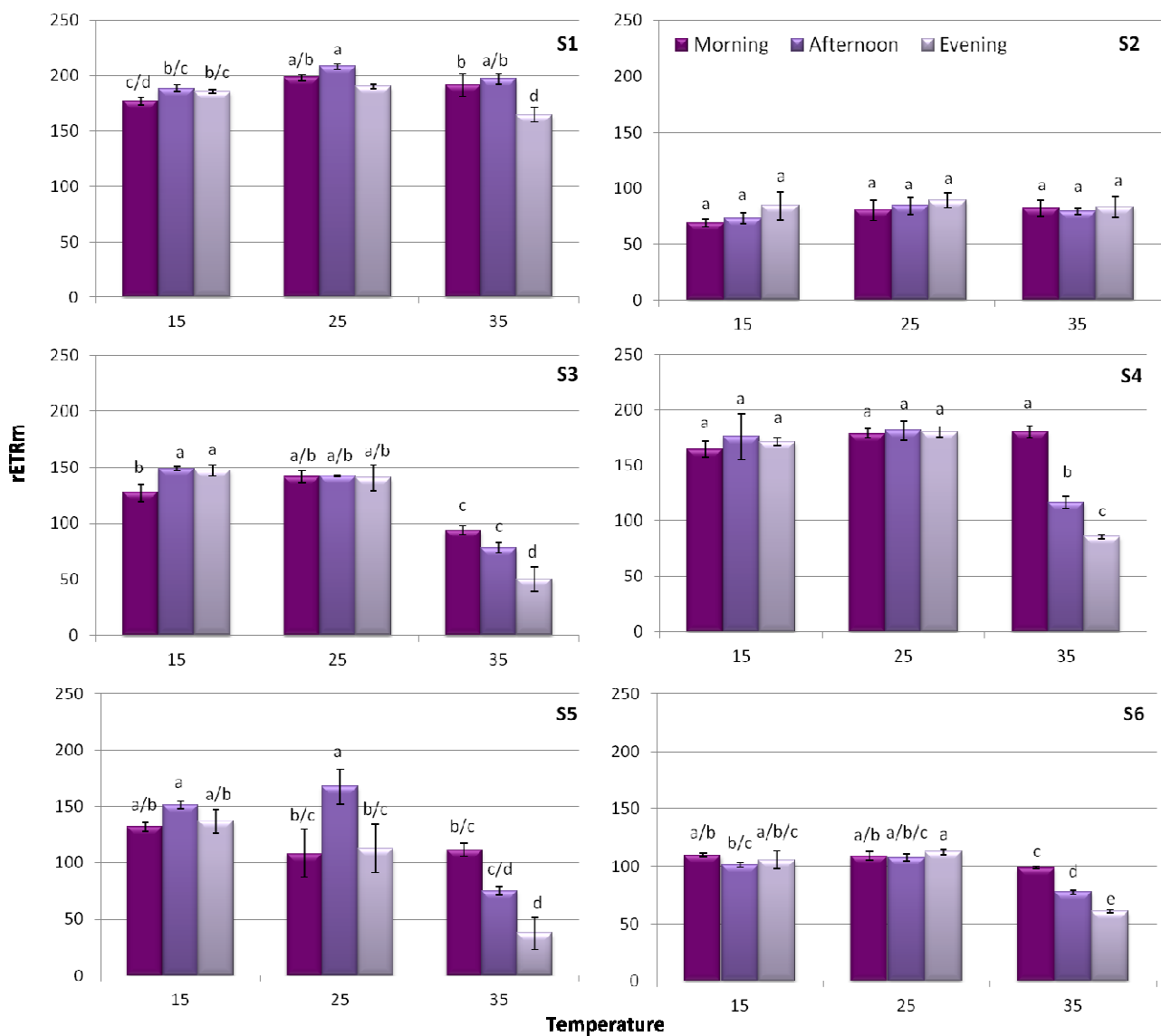


Figure III.4. Means and standard errors of maximum Electron Transport Rate (ETRm, $\mu\text{mol electrons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) as a function of the storage temperature and time-in-storage (Friedman test: for each sample, values that did not differ at the 0.05 level were assigned the same letter).

III.3.5. Pigment degradation

Four datasets were available for each of the 6 samples: one at the beginning of the experiment (morning, just after sampling) and three after 12 hours of conservation under the three temperature conditions. Initial conditions revealed large differences in terms of amounts of pheopigments involved in the photosynthetic equipment of the different samples (Table III.2). Pheo *a* / Chl *a* ratio was particularly high for surface samples collected in Bevinco Cove (S3, 45 %) and in the bottom layer of Grau Channel (S2, 41 %), but minimal for surface samples collected in Grau Channel (S1, 18 %) and Forca Cove (S5, 22 %) and in the bottom layer of the Bevinco Cove (S4, 21 %). Intermediate values were found at Fossone Channel (S6, 29 %). We failed to identify any relationship between these different values and the origin of the samples involved (e.g. location within the lagoon; structure of the water column). After one day of storage, we observed a chaotic pattern of variation in Pheo *a* / Chl *a* ratio, which decreased 20 % for S2 but showed no change in S1, whatever the temperature. A mean increase close to 50 % was observed for the other samples at 35 °C, yet this was still not as strong as the 77 % increase observed at 25 °C for S6. Finally, at 15°C, Pheo *a* / Chl *a* ratio tended to increase (+ 6 %) for samples S3 to S5 and showed a strong + 29 % in S6 samples. A global comparison using the Wilcoxon's signed rank test confirmed that the observed fluctuations could not be assigned to any specific trend and remained in the domain of random fluctuations (Table III.2).

Table III.2. Pheo *a* / Chl *a* ratios in the morning and variation after one day in storage for each sample, and probabilities when these variations are globally compared at evening.

Sample	Pheo <i>a</i> / Chl <i>a</i>	Evolution (% change of the morning values)			P values (Wilcoxon signed-rank test)		
	Morning	15°C	25°C	35°C	[15°C - 25°C]	[15°C - 35°C]	[25°C - 35°C]
S1	0.18	-0.04	-0.07	-0.04	0.094	0.063	0.313
S2	0.41	-0.19	-0.19	-0.17			
S3	0.45	0.03	0.20	0.23			
S4	0.21	0.09	0.34	0.59			
S5	0.22	0.08	0.20	0.34			
S6	0.29	0.26	0.77	0.59			

III.4. Discussion

PAM fluorescence is a rapid and reliable method that is gaining in popularity for assessing the photosynthetic performance of marine and fresh water phytoplankton (Schreiber *et al.*, 1994; Baker, 2008). Maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm) is classically used as a sensitive indicator of the general level of fitness of photosynthetic organisms (Kolber & Falkowski, 1993; Schreiber *et al.*, 1994; Lippemeier *et al.*, 1999; Maxwell & Johnson, 2000; Parkhill *et al.*, 2001). While maximal Fv/Fm values can change depending on the dominant phytoplankton classes (Büchel & Wilhelm, 1993), non-limited algal communities exhibit Fv/Fm values around 0.6 to 0.7 (Kromkamp & Peene, 1999; Yentsch *et al.*, 2004). Fv/Fm values higher than 0.5 are classically associated to a satisfactory physiological acclimation of phytoplankton to environmental conditions (Parkhill *et al.*, 2001; Yentsch *et al.*, 2004; Claquin *et al.*, 2010), whereas lowest values have been related to nutrient deficiency in natural conditions (e.g. Kolber & Falkowski, 1993). Changes in Fv/Fm (and/or other fluorescence-induced proxies) can thus provide relevant information on the effects of different types of stressors on photosynthetic organisms, and are increasingly being used for this purpose.

As photosynthetic organisms are rapidly affected by changes in their environment, it is logically recommended to analyze their physiological properties without delay after collection. However, the number of samples and analytical procedures needed to obtain valuable data sometimes makes immediate analysis impracticable, forcing delays – and thus storage concerns – between sampling and measurements. The purpose of this study was to evaluate the effects of conservation conditions (temperature and duration) on PAM-fluorescence parameters in phytoplankton communities.

Morning (Fv/Fm) values - We used a series of samples contrasting in terms of origin (salinities varying between 4.8 and 36.9 psu), sampling locations (sub-surface versus deep) that correlatively showed significant differences in phytoplankton dominance (Cyanophyceae versus Diatomophyceae and Dinophyceae) on *in situ* BBE-Moldaenke FluoroProbe measurements, and health status (initial Fv/Fm values varying between 0.21 and 0.61). The purpose of using such different communities was to profile general rules on

conservation conditions with the aim of providing valuable general guidelines and recommendations.

At the beginning of the experiment, the phytoplankton assemblages collected in Grau Channel were both dominated by Diatomophyceae and/or Dinophyceae, but morning Fv/Fm values revealed very different photosynthetic performances, with a healthy community in sub-surface (Fv/Fm = 0.56) but a clearly disturbed community in the bottom layer (Fv/Fm = 0.21). In Bevinco Cove, stratification of the water column isolated two different water masses, where Chlorophyta dominated the surface whereas Diatomophyceae and/or Dinophyceae dominated the bottom layer. In both cases, morning Fv/Fm values were close to 0.6 (0.61 and 0.58, respectively), reflecting a good initial physiological status. The same pattern was found for the sample collected in the brackish artificial Fossone Channel (S6) that showed a complex phytoplankton community and a fairly good initial physiological status (Fv/Fm = 0.60). Finally, morning Fv/Fm values of the Forca Cove sample (S5) were low (Fv/Fm = 0.34). In this warm (mean daily temperature 20-23 July: 31.0 °C; CV = 4.1 %) and shallow embayment, Cyanophyceae were dramatically dominant. However, this low Fv/Fm-value should be interpreted cautiously, as it may not necessarily reflect poor physiological status due to this cyanobacterial dominance. The measurement and interpretation of variable fluorescence parameters in Cyanophyceae is made complex by the cyanobacterial light-harvesting machinery that has characteristics that may cause lower Fv/Fm levels than those observed in eukaryotic phytoplankton (Büchel & Wilhelm, 1993; Campbell *et al.*, 1998). Variable fluorescence theory traditionally assumes that the two components of Fv/Fm (i.e. Fo and Fv) should both originate from PSII (Krause & Weis, 1991). In Cyanophyceae, Fv does seem to originate from PSII, but phycobiliprotein fluorescence, the small fraction of cellular Chl *a* that is in PSII, and possibly also Chl *a* in PSI all form a part of Fo, which may lower Fv/Fm (Campbell *et al.*, 1998). Moreover, Cyanophyceae tend to have variable ratios of PS I and PS II complexes, and they show large state transitions that lead to high flexibility in excitation energy distribution between the two photosystems (Allen, 1992). The key requisite for the PAM technique is to saturate PSII within a single PSII turnover, i.e. by applying a short but highly energizing saturation pulse (Falkowski & Kolber, 1995). If PSII saturation is incomplete, the measurements will underestimate Fm, and thus Fv/Fm ratio. Consequently, in line with Raateoja *et al.* (2004), we argue that in the case of the Forca Cove

sample (S5), it was the incomplete saturation of PSII that caused the observed low Fv/Fm, and not a physiological deficiency of the Cyanophyceae dominated phytoplankton assemblage.

Conservation effects - In most cases, cooling samples (i.e. storage at 15 °C) had no evident impact on the different parameters deduced from the Phyto-PAM measurements, neither at short term nor after a whole day of conservation. When samples were stored at “room-temperature” (25 °C), the dominant tendency was a slight decrease in photosynthetic efficiency over the day. Storage at 35 °C induced various impacts depending on the samples. Compared to values measured at 15 °C and 25 °C, morning values showed an immediate decrease in most of the parameters in almost all the samples. This tendency for photosynthetic efficiency to decrease over the course of the day was more or less pronounced, being clearly apparent in samples S3, S4, S5 and S6 but completely absent for the S2 sample and visibly marginal for S1. In the first instance, our results seemed to confirm that storing samples at warm temperature can erode their photosynthetic capacities, with a cumulative effect as the storage duration increased, but not for the sample whose initial physiological status already indicated significant degradation of its photosynthetic machinery. These results are consistent with many studies (Eppley, 1972; Davison, 1991; Groom & Baker, 1992; Fiala & Oriol, 1990; Derraz *et al.*, 1995; El-Sabaawi & Harrison, 2006; Claquin *et al.*, 2008; Hancke *et al.*, 2008).

Redundancy of photosynthetic parameters - Fv/Fm, Φ PSII and α , all of which measure photosynthetic efficiency (Ralph & Gademann, 2005; El-Sabaawi & Harrison, 2006), presented the same pattern of change in response to the different treatments. Measurements of photosynthetic efficiency are deduced from min-max fluorescence values: maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm: on dark-adapted samples) and effective quantum yield of PSII (Φ PSII: on light-adapted samples; Genty *et al.*, 1989). Φ PSII also gives an indication of the amount of energy used in photochemistry. In the RLC, the upslope in the light-limiting region (α) is proportional to the efficiency of light capture (effective quantum yield; Schreiber, 2004). Thus, it is logical to deduce from our experiments that these three parameters shared the same patterns of variation, as they are closely correlated (Röttgers, 2007).

rETR values provided complementary indications. Under moderate irradiance, the capacity of the electron transport chain limits photosynthesis, and the curve reaches a plateau where maximum photosynthetic capacity occurs (Schreiber, 2004). When there is an increase in the rate at which electrons are transported away from PSII, it is mainly due to the light-induced activation of enzymes involved in carbon metabolism and the opening of stomata. Such quenching is referred to as “photochemical quenching” (Maxwell & Johnson, 2000). This parameter was completely unaffected by a complete day of storage at 15 °C.

The E_k parameter provides further information. Minimum saturating irradiance (E_k) is graphically determined by the interception of the slope (α) in the light-limited area of the RLC curve and the maximum photosynthetic rate (rETR, plateau of the RLC; Sakshaug *et al.*, 1997). E_k is widely used as a parameter to characterize the photoacclimation status of microalgae (e.g. Falkowski, 1984; Behrenfeld *et al.*, 2004, 2008). Here, E_k values appeared maximal, but also fluctuated strongly in samples S2 and S5. For S2, this fluctuation could partly be due to the poor initial physiological status of the algae, whereas for S5, the dominance of Cyanophyceae is directly involved, as the Phyto-PAM model we used cannot reliably assess the photosynthetic performances of such organisms (Raateoja *et al.*, 2004).

Reference values - Ideally, control measurements should have been performed immediately after sampling (say, after 30 min of dark adaptation at *in situ* temperature). These data would have provided the initial status of the studied phytoplankton communities, i.e. three replicates measured between 30 min and < 1 hour after sample collection. Such measurements would have made it possible to compare the very first measurements performed (i.e. samples stored at 15 °C measured in the morning) against the results of these “immediate” *in situ* analyzes. Figures III.2, III.3 and III.4 clearly illustrate the day-long stability of the photosynthetic performances of samples stored at 15 °C. We thus assume that this stability would not have been disturbed immediately after sampling (i.e. during the first two hours of time-lag between sample collection and the first analyses performed). In the absence of an *in situ* control performed immediately after sampling, (i) the incompressible delays imposed between sampling and analyses, and (ii) the relative stability of PAM proxies throughout the day for samples stored at 15 °C prompted us to

assume an absence of drift for this treatment which, furthermore, is recommended as “good practice”.

The different short term responses to photon flux variations, including darkness, which may disturb fluorescence proxies of phytoplankton samples have been recently summarized by Ihnken *et al.* (2010), who have shown in particular that the photosynthetic response during RLC can be manipulated by the RLC duration and the dark incubation period preceding the RLC and that, depending on the purpose of RLC application, results might be distorted by artefacts. If fully de-activated cells are desired, dark incubation times should allow sufficient time for species-specific NPQ and chloroplast enzyme de-activation. This last indication might be considered as a methodological principle to strengthen the comparability of samples collected in different locations that have to be stored before analyzes. A prolonged storage in darkness may act as a “re-initialization” of their fluorescence characteristics and will then allow the measurement of intrinsic fluorescence properties, without in particular the “noises” associated to their short term light history and adaptation.

However, same authors (and others; see in particular Cruz & Serôdio, 2008) indicated that results remain often controversial (in the framework of rapid light curves RLC PAM-performed): when PAM-fluorescence measurements are performed in targeting RLC proxies, specific methodological precautions have to be applied, that involve in particular the collection of series of contrasted samples in terms of light-history to obtain valid results. This was definitively out of the scope of our experiment.

Pigment degradation during the experiment - The various conservation temperatures and durations did not induce any statistically significant alteration in the pigmentary machinery of the studied samples. The Pheo *a* / Chl *a* ratios found in our samples early in the morning appeared particularly high compared to classically ‘standard’ values for natural phytoplankton communities in good physiological state (Collos *et al.*, 2005). However, it appears difficult to attribute these high values to a physiological deficiency of our samples, as the morning values of photosynthetic parameters for several samples corresponded to efficient communities. Such high morning values for pheopigment ratio may alternatively be attributed to diurnal cycles involving a complex combination of intrinsic and environmental processes (phytoplankton growth, zooplankton grazing, cell sinking, cell senescence and

mortality, photodegradation, and photoadaptation-induced changes in cellular pigment concentration), all of which can cause variations in total pigment concentration and composition (Stramska & Dickey, 1992). Numerous studies have been conducted in both marine and fresh water environments to document and elucidate the different factors controlling diel patterns of photosynthesis, algal biomass, cell size, cell components. While irradiance is logically a major driving function, there is still a lot of evidence to suggest that the photosynthetic rhythms observed in the field result both from intrinsic oscillation in the phytoplankton cells and fluctuating environmental factors (Sournia, 1974; MacCaull & Platt, 1977). Either way, the evolutions in Pheo *a* / Chl *a* pigment ratio observed after one day of storage (% morning; Table III.2) were not statistically different between the different temperatures tested (Wilcoxon's rank test). Thus, we assumed that the variations of the different fluorescence parameters observed during the day were not associated to degradation in the pigmentary equipment of our samples.

III.5. Recommendation

The PAM fluorometric technique has opened up new possibilities for assessing plant physiological status. It is classically recommended to carry out measurements without delay after collection, but the number of samples and the analytical procedures needed to obtain valuable datasets sometimes makes immediate analysis impracticable, forcing delays between fluorescence measurements. The aim of this study was to investigate the effects of conservation conditions on photosynthetic parameters in different phytoplankton communities (pigmentary groups discriminated in situ by a BBE fluoroprobe) sampled during summer in different environmental locations of a Mediterranean lagoon (Biguglia lagoon, Corsica, France). PAM-fluorescence parameters were measured after three different conservation durations (2 h to 4 h, 6 h to 8 h, and 10 h to 12 h after collection) on samples stored at three different temperatures (15 °C, 25 °C and 35 °C). It was not possible to realize immediate measurements after sampling (i.e. on the boat): the two hours time-lag between sampling and the first measurements corresponded to an incompressible delay. However, the absence of significant deviations over the course of the day for samples stored at 15 °C suggested that sample fluorescence characteristics would also not have evolved during the short time-lag separating collection and the first series of measurements performed in the morning. We thus recommend this storage and conservation strategy for phytoplankton

samples collected in warm or tropical environments, even for relatively long durations. Results also showed that storage at the highest temperature (35 °C) severely impacted photosynthetic parameters, with cumulative effects as storage duration increased. Storage at “room temperature” (25 °C) only appeared a valid option if measurements have to be carried out strictly within a very short delay.

Conservation of samples at 15 °C thus appeared the best solution when sampling-to-analysis delay goes over a few hours. Long-term storage (> 8 h) should definitively be avoided.

CHAPITRE IV

Quantification and taxonomic discrimination of phytoplankton in coastal environments (Mediterranean Sea) using FluoroProbe®: Preliminary *in situ* and *in vivo* results



IV.1. Introduction

Coastal ecosystems are becoming increasingly exposed to nutrient enrichment driven mainly by urbanization, tourism and agricultural activities (Justic *et al.*, 1995). These enrichments result in the eutrophication of coastal waters (Nixon, 1995) accompanied by an increased occurrence of harmful microalgae and harmful algal blooms (HABs; Smith *et al.*, 1999; Smayda, 2008). In the Mediterranean coastal environment (lagoon and sea), the proliferation of harmful species may be due to nutrient-rich fresh water inputs from urban and agricultural activities (Paerl, 1997; Collos *et al.*, 2004; Zingone *et al.*, 2006; Spatharis *et al.*, 2007). This state is often associated with adverse impacts on the ecosystem (Graneli & Turner, 2006), which jeopardizes ecosystem services and reduces their amenity value.

In response to the degradation of water resources, the EU Water Framework Directive 2000/60/EC (WFD) aims to maintain and improve aquatic environments in the European Community by providing a framework for the protection of ground, inland surface, transitional and coastal waters. According to the WFD, the phytoplankton metrics that are fundamental in defining and classifying the ecological status of surface waters are biomass (as Chl *a*), community changes (composition and species abundance), and increased frequency and intensity of blooms. In the Mediterranean Sea (one of the most oligotrophic marine environments in the world; Krom *et al.*, 1991) and Mediterranean lagoons, chlorophyll concentrations represent a simple and integrative measure of phytoplankton community response to nutrient enrichment or succession. Chl *a* extracts are generally measured spectrophotometrically according to Lorenzen (1967) or spectrofluorimetrically according to Neveux and Lantoiné (1993). Chl *a* measurement methods remain labor-intensive and heavily time-consuming. At a global spatial scale, remote sensing can provide synoptic views of Chl *a* surface distributions. However, compared to open ocean waters, most estuarine and coastal waters are optically complex, which complicates the estimation of Chl *a* concentrations (e.g. Dall'Olmo *et al.*, 2005; Darecki & Stramski, 2004).

However, a eutrophication-driven increase in Chl *a* is always accompanied by changes in phytoplankton community structure in terms of total abundance, species richness, and evenness in coastal (Tsirtsis *et al.*, 2008) and transition waters (Bec *et al.*, 2011a). Various

materials and methods for monitoring phytoplankton communities are now available. The Utermöhl method (Utermöhl, 1958) with traditional microscopy cell counts, is the only one that enables taxonomical resolution at species level for larger phytoplankton, and is widely employed in routine coastal surveys on toxic species. However, taxonomical identification requires an experienced analyst, and is controversial for cells smaller than ~10 µm. Indeed, taxonomy is not easily related to functionality, which is the pivotal information needed for assessing the ecological status of an ecosystem (Reynolds, 2002). Pigment analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) gives a highly reproducible and relatively rapid bulk estimate of the major phytoplankton groups present in a sample (Mantoura & Llewellyn, 1983; Wright & Shrager, 1984; Wright & Jeffrey, 1997; Vidussi *et al.*, 2001). Various algal groups can be identified by detecting diagnostic marker pigments, known as accessory pigments. Typical marker pigments include peridinin (Dinophyceae marker), Chl *b* (mainly Chlorophyta marker), fucoxanthin (Diatomophyceae marker), zeaxanthin (Cyanophyceae marker) and alloxanthine (Cryptophyta marker; Claustre, 1994; Vidussi *et al.*, 2001; Marty *et al.*, 2008; Bel-Hassen *et al.*, 2009). However, the lack of pigment specificity with some groups spurred the need to couple HPLC with optical microscopy in order to identify dominant and sub-dominant species (Havskum *et al.* 2004), but at a cost of adding labor-intensive and heavily time-consuming processes. Flow cytometry was used to analyze the abundant picophytoplankton cells (Marie *et al.*, 1997; Jacquet *et al.*, 1998; Bec *et al.*, 2005), but technical developments have extended the size range to the largest cells, up to hundreds of microns, depending on their natural abundance and on the volume analyzed. One such example is *in situ* flow cytometry, but it is still necessary to couple these instruments with HPLC and optical microscopy analyses in order to collect reliable information on phytoplankton responses to the environment status (Thyssen *et al.*, 2008; 2011).

Beutler *et al.* (2002) designed a multi-wavelength probe, the Fluoroprobe® (FP), as a submersible spectrofluorometer that can operate down to a depth of 100 m and provide automatic algal class and chlorophyll analysis based on the *in vivo* autofluorescence characteristics of pigment-containing micro-organisms. The probe contains five light-emitting diodes (450, 525, 570, 590, and 610 nm) for the excitation of pigments present in the phytoplankton, and a 370 nm diode for the excitation and subsequent subtraction of the

fluorescence from dissolved organic matter ('yellow substances'). According to the manufacturer, the "spectral" groups discriminated by the probe include 4 different phytoplankton groups: 'brown' algae (Dinophyceae, Diatomophyceae and Chrysophyta), 'green' algae (Chlorophyta and Euglenophyta), 'blue' algae (Cyanophyceae) and 'red' algae (cryptophyta). This method is now widely applied in both *in vivo* and *in situ* phytoplankton community composition studies by members of the scientific community and managers of fresh water resources (lakes and reservoirs; Leboulanger *et al.*, 2002; Gregor & Maršálek, 2004; Gregor *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2010; Catherine *et al.*, 2012), despite not enabling the same level of taxonomic identification as microscopic methods. However, in natural environments, relationships between fluorescence, Chl *a* and different phytoplankton groups are affected by strong variability linked to phytoplankton community structure, environmental conditions, physiological status, cell morphology, quenching and irradiance history, making the conversion to phytoplankton biomass imprecise (McIntyre *et al.*, 2010). These authors reveal that relationships between fluorescence and Chl *a* are robust when the dynamic range of the signal is large enough, and when there is qualitative agreement between classes by spectral fluorescence signatures and other analytical methods. Few studies have focused on coastal and transition waters. See *et al.* (2005) reported in the Gulf of Mexico that Diatomophyceae and Dinophyceae were comparable under HPLC-chemical taxonomy analysis, whereas green algae and cryptophytes were overestimated. Richardson *et al.* (2010) show in two southeastern United States estuaries that estimates of biomass (as Chl *a*) and taxonomic structure were consistent with those from HPLC-derived marker pigments when working with the AOA, a spectral fluorometer that functions on the same principle as the FP. Houliez *et al.* (2012) examined the possibility of using the probe for monitoring the dynamics of *Phaeocystis globosa* in the coastal waters of the eastern English Channel by calibrating the device with species representative of the region-of-interest. MacIntyre *et al.* (2010) in coastal waters show that numerous parameters can affect information given by *in situ* fluorometry, including salinity, scatter light, Colored Dissolved Organic Matter (CDOM; Lawrenz *et al.*, 2010) or physiological status of phytoplankton communities. To our knowledge, no study has yet investigated the use of FP in a Mediterranean region with oligotrophic marine waters and eutrophic lagoon environments.

In an effort to transition the use of the submersible spectrofluorometer into lagoon and marine coastal waters (Mediterranean Sea), our study aimed to provide the first assessment of the ability of the FP to estimate phytoplankton biomass and discriminate among spectral groups of phytoplankton in contrasted environments. We compared FP estimates of biomass (Chl *a*) to HPLC values and FP estimates of taxonomic structure to HPLC-derived marker pigments *in situ* and *in vivo*. Finally, we discuss the accuracy (in terms of biomass concentration) of FluoroProbe in contrasted environments.

IV.2. Materials and methods

IV.2.1. Study area and sampling sites

Coastal waters were sampled regularly every season from summer 2010 to spring 2012, around Corsica Island (France, Mediterranean Sea). Water bodies were selected to represent a wide range of environmental conditions (e.g. salinity, turbidity) and trophic statuses (from oligotrophic to eutrophic; Krom *et al.*, 1991; Antoine *et al.*, 1995; Bec *et al.*, 2011a). Marine environment chosen was the Bay of Calvi, which is characterized as relatively untouched by human impact (Goffart *et al.*, 2002). Lagoon environment chosen was Biguglia lagoon, a confined eutrophic ecosystem with a spatial salinity gradient (Mouillot *et al.*, 2000). Each campaign investigated marine stations from the surface down to -100 m (every 10 m; euphotic zone) and sampled lagoon stations at sub-surface and in depth. Vertical profiles were performed on each station using the FP submersible spectrofluorometer. Water samples for *in vivo* measurement with FP and HPLC analyses were collected with a Niskin-like bottle (deep samples) or directly from the boat (sub-surface samples) and immediately distributed into three different opaque 1 L flasks, after filtration on a 200- μ m mesh filter to eliminate mesozooplankton and large debris.

IV.2.2. Spectro fluorometer analysis: FluoroProbe

Phytoplankton biomass (expressed in μ g eq. Chl *a*.L⁻¹) was measured fluorometrically *in situ* and *in vivo* using a FluoroProbe® (BBE-Moldaenke, Kiel, Germany). This device can differentiate between “spectral” groups of phytoplankton both *in vivo* and *in situ*, and provides vertical profiles on the basis of relative Chl *a* fluorescence intensity at 680 nm (due to the photosystem II (PSII) core pigments; Beutler *et al.*, 2002; Leboulanger *et al.*, 2002;

Gregor & Marsálek, 2004). Emission of fluorescence with the FP follows sequential light excitation by 5 Light Emitting Diodes (LEDs), segregate 'green' algae (Chlorophyta and Euglenophyta; 470 nm) rich in Chl *a* and *b*, 'brown' xanthophyll-containing algae (Diatomophyceae, Dinophyceae and Chrysophyta; 525 nm), 'red' phycoerythrin-rich algae (Cryptophyta; 570 nm), and blue phycocyanin-rich algae (Cyanophyceae; 590 and 610 nm; Beutler *et al.*, 2001; 2002). Depending on the accessory pigments of the light-harvesting complexes, and thus the phylogenetic position of the phytoplankters present in the sample (Catherine *et al.*, 2012), the system detects a set of characteristic fingerprints that are used by dedicated software to calculate the relative respective contributions of each algal class to global phytoplankton biomass ($\mu\text{g eq. Chl.L}^{-1}$; Beutler *et al.*, 2002). The UV LED (370 nm), which has been added to the latest generation of devices, is used to measure the fluorescence of CDOM, referred to as 'yellow substances'. The FP software is able to correct for CDOM. Given the highly contrasting environments sampled, the FP was used with factory calibration.

The FP was lowered down the water column in order to visualize the distribution of phytoplankton biomass and community structure. Recording window was 1 min for each depth considered. At the lab, the probe was used for *in vivo* measurements on 25 mL placed in the original optical glass cuvette (25 mm \times 25 mm \times 70 mm) fitted into the FP. A magnetic stirrer and a homemade plastic shading box were used to stabilize the fluorescence signal. The recording window was 1 min for each sample, after which data were expressed as the mean equivalent concentration of Chl *a* for each phytoplankton group identified from the fluorescence signals and total Chl *a*. Due to technical issues, sampling strategy is not strictly identical *in situ* and *in vivo*. The *in vivo* sampling strategy has a greater number of measures in lagoon environments (as the FP cannot be used *in situ* in very shallow waters) and *in situ* sampling strategy has a larger number of measurements in marine waters.

IV.2.3. Pigment determination

Pigments were analyzed by HPLC (Waters Alliance 2695) as in Zapata *et al.* (2000). We used a C8 column to carry out the analytical separation. Column polarities and type of solvent influence the separation of the molecules due to the chemical environment of the unit. 1 L of sample was filtered under low-vacuum pressure (< 200 mm Hg) through

Whatman GF/F filters (25 mm diameter) and immediately stored at -20°C or at -80°C where possible. Samples were extracted in methanol using sonication (Jeffrey *et al.*, 1997). In order to establish the correlation with FP results, marker pigments are used with (i) Chl *a* (for phytoplankton biomass), (ii) fucoxanthin and peridinin (for Diatomophyceae and Dinophyceae), (iii) zeaxanthin (for Cyanophyceae), (iv) Chl *b*, prasinoxanthin and lutein (for Chlorophyta) and (v) alloxanthin (for Cryptophyta; Claustre, 1994; Vidussi *et al.*, 2001; Marty *et al.*, 2008; Bel-Hassen *et al.*, 2009).

IV.2.4. Statistical analysis

As data distributions were not normal even after logarithmic transformation, nonparametric Spearman rank correlations were used to identify the relationships between the HPLC values, total equivalent Chl *a* provided by the FP, and Chl *a* pigment class equivalents obtained by the FP. All analyses were carried out on XLStat® V2011 5.01 statistical software.

IV.3. Results

The dataset was collected from marine and lagoon environments and contrasted in terms of depth and abiotic parameters (Table IV.1). Chl *a* concentrations for the marine environment were lower compared to the lagoon environment, where the variations are much larger (Table IV.1). *In vivo*, Chl *a* concentrations ranged from 0.28 to 84.15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with HPLC analysis and from 0.07 to 67.70 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with FP measurements. *In situ*, Chl *a* concentrations ranged from 0.11 to 42.15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with HPLC analysis and from 0.00 to 17.92 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with FP measurements. The range of Chl *a* concentrations was broader with *in vivo* measurements compared to *in situ* measurements.

The relationships between Chl *a* concentrations given by *in vivo* and *in situ* FP measurements and HPLC analysis were very strong (Figure IV.1). Nevertheless, relationships were significantly higher between *in vivo* measurements and HPLC analysis than between *in situ* measurements and HPLC analysis. To further assess the ability of FP data to estimate phytoplankton biomass, we tested the relationships observed for each of the 4 phytoplankton groups discriminated by the probe.

Table IV.1. Main limnological characteristics of the coastal waters sampled.

	Min	Max
Marine waters		
Chl <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$, HPLC analysis)	0.11	0.75
Depth (m)	-1.0	-100.0
Salinity (PSU)	37.6	38.2
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	12.4	26.4
Total Silicate (μM)	0.8	2.1
Total Nitrate (μM)	0.0	1.3
Total Nitrite (μM)	0.0	0.3
Lagoon waters		
Chl <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$, HPLC analysis)	0.28	84.15
Depth (m)	-0.2	-1.5
Turbidity (NTU)	0.7	21.2
Salinity (PSU)	0.2	36.5
Dissolved Oxygen (%)	40.2	130.4
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	7.7	32.6
Total Ammonium (μM)	2.6	85.9
Total Silicate (μM)	0.2	34.0
Total Nitrate (μM)	0.0	0.6
Total Nitrite (μM)	0.0	0.9

For 'browns' group relationships, correlations between HPLC analysis (fucoxanthin and peridinin) and *in vivo* FP measurements (Diatomophyceae and Dinophyceae) were highly significant ($\rho = 0.90$, $p < 0.0001$, $n = 50$) and were even higher with *in situ* FP measurements ($\rho = 0.92$, $p < 0.0001$, $n = 76$; Figure IV.1). For 'greens' group relationships, correlations were weakly significant with *in vivo* FP measurements ($\rho = 0.71$, $p < 0.0001$, $n = 50$) and non-significant with *in situ* FP measurements ($\rho = 0.43$, $p = 0.000$, $n = 76$; Figure IV.1). Like for the 'green' group, 'blues' group relationship correlations were weakly significant between HPLC analysis (zeaxanthin) and *in vivo* FP measurements (Cyanophyceae; $\rho = 0.59$, $p < 0.0001$, $n = 50$) and non-significant with *in situ* FP measurements ($\rho = 0.34$, $p = 0.003$, $n = 76$; Figure IV.1). For 'reds' group relationships, correlations between HPLC analysis (alloxanthin) and both *in vivo* and *in situ* FP measurements (Cryptophyta) were non-significant ($\rho = 0.49$, $p = 0.000$, $n = 50$ and $\rho = 0.30$, $p = 0.009$, $n = 76$, respectively; Figure IV.1). For all the relationships established between HPLC analysis and FP measurements, correlations were always higher with *in vivo* measurements compared to *in situ* measurements, except for the 'browns' group, despite lower n values with *in vivo* FP measurement (Figure IV.1).

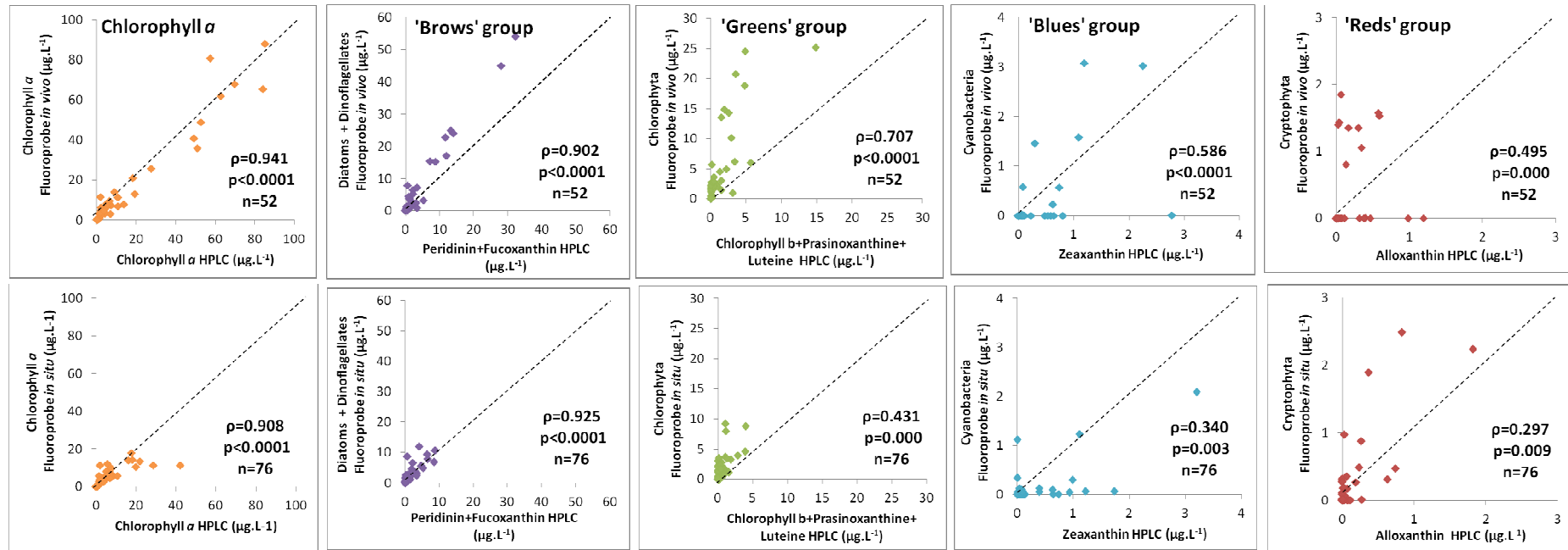


Figure IV.1. Relationships between Chl *a*, phytoplankton groups obtained from *in situ* and *in vivo* FP measurements, and HPLC analysis. The dashed line corresponds to the 1:1 relationship.

In order to assess FP performances in a context of low-concentration phytoplankton biomass (as sometimes found in lagoon environments and frequently found in oligotrophic marine environments), the relationships were analyzed for the different classes separately. As the dataset has a larger number of measurements with low concentrations (Figure IV.1), we chose to successively halve the max. Concentration obtained on the submersible spectrofluorometer. FP data were assigned to these classes, and the associated HPLC analyses were plotted to test whether the FP was able to accurately detect the different Chl *a* concentrations and phytoplankton groups. As a result, we tested each relationship between HPLC analysis and *in vivo* and *in situ* FP measurements by classes (Table 2). Relationships between Chl *a* concentrations given by FP and HPLC were still significant for concentrations ranging from 0.0 to 4.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for *in vivo* measurements ($p = 0.81$, $p < 0.001$, $n = 24$) and ranging from 0.0 to 0.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for *in situ* measurements ($p = 0.74$, $p < 0.001$, $n = 20$; Table IV.2). Below these maximum concentrations, the number of observations limited the significance of correlations (Table IV.2). The results are similar for the 'browns' group with concentrations ranging from 0.0 to 1.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for *in vivo* sampling ($p = 0.82$, $p < 0.001$, $n = 29$) and from 0.0 to 0.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for *in situ* sampling ($p = 0.78$, $p < 0.001$, $n = 22$; Table 2). The best *in vivo* relationship for the 'greens' and 'blues' groups corresponds to concentrations ranging from 0.0 to 4.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0.59$, $p < 0.001$, $n = 50$) and from 0.0 to 20.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($p = 0.67$, $p < 0.001$, $n = 47$), respectively (Table IV.2). For all the relationships, correlations were not significant whatever the number of observations or concentrations considered (Table IV.2).

Table IV.2. Relationships between Chl *a* and phytoplankton groups based on *in vivo* and *in situ* FP measurements and HPLC analysis (Spearman correlation). Maximum concentrations obtained with the FP are successively halved. Values in bold are different from 0 at significance level alpha = 0.0001.

<i>In vivo</i> relationships	Concentrations obtained with the FP (µg.L-1)	n	ρ	p-value
Chlorophyll <i>a</i> FP / HPLC	< 67.7	50	0.941	< 0.0001
	< 33.9	44	0.913	< 0.0001
	< 16.9	42	0.900	< 0.0001
	< 8.5	37	0.911	< 0.0001
	< 4.2	24	0.810	< 0.0001
	< 2.1	18	0.595	0.01
	< 1.1	18	0.595	0.01
	< 0.5	5	-	-
'Browns' group FP / HPLC	< 54.2	50	0.902	< 0.0001
	< 27.1	48	0.89	< 0.0001
	< 13.5	42	0.836	< 0.0001
	< 6.8	40	0.857	< 0.0001
	< 3.4	35	0.869	< 0.0001
	< 1.7	29	0.821	< 0.0001
	< 0.8	21	0.644	0.002
	< 0.4	16	0.374	0.153
'Blues' group FP / HPLC	< 4.2	50	0.586	< 0.0001
	< 2.1	47	0.464	0.001
	< 1.1	45	0.368	0.013
'Greens' group FP / HPLC	< 40.4	50	0.707	< 0.0001
	< 20.2	47	0.648	< 0.0001
	< 10.1	43	0.561	0.000
	< 5.1	40	0.53	0.001
'Reds' group FP / HPLC	< 1.8	50	0.495	0.000
	< 0.9	42	0.275	0.078
<i>In situ</i> relationships				
Chlorophyll <i>a</i> FP / HPLC	< 17.9	76	0.908	< 0.0001
	< 9.0	66	0.873	< 0.0001
	< 4.5	59	0.829	< 0.0001
	< 2.2	48	0.687	< 0.0001
	< 1.1	46	0.645	< 0.0001
	< 0.6	42	0.629	< 0.0001
	< 0.3	20	0.736	< 0.0001
	< 0.2	13	-	-
'Browns' group FP / HPLC	< 11.9	76	0.925	< 0.0001
	< 6.0	69	0.91	< 0.0001
	< 3.0	63	0.883	< 0.0001
	< 1.5	53	0.841	< 0.0001
	< 0.7	47	0.78	< 0.0001
	< 0.4	42	0.753	< 0.0001
	< 0.2	22	0.778	< 0.0001
	< 0.1	14	-	-
'Blues' group FP / HPLC	< 2.1	76	0.34	0.003
	< 1.0	73	0.331	0.004
'Greens' group FP / HPLC	< 9.2	76	0.431	0.000
	< 4.6	73	0.359	0.002
'Reds' group FP / HPLC	< 2.5	76	0.297	0.009
	< 1.2	73	0.187	0.113

IV.4. Discussion

Based on the dataset reported here, we evaluated the reliability of FP data in estimating phytoplankton biomass in contrasting Mediterranean marine and lagoon water environments. We found a strong and highly significant correlation between the Chl *a* concentrations given by *in vivo* and *in situ* FP measurements and HPLC analysis. Our results are in agreement with literature data on lakes and reservoirs (Gregor & Marsalek, 2004; Gregor *et al.*, 2005; Rolland *et al.*, 2010; Catherine *et al.*, 2012) and marine and transition waters (See *et al.*, 2005; MacIntyre *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2010; Houliez *et al.*, 2012). Errors in absolute concentration assessments could come from various sources. Differences in abiotic environment (e.g. light, temperature, salinity, nutrient concentrations, CDOM; Lawrenz *et al.*, 2010; MacIntyre *et al.*, 2010), duration of sample pre-acclimation in the dark, and phytoplankton community composition could all affect fluorescence responses, resulting in variations in the fluorescence-to-chlorophyll *a* ratio (F^{chl}) used to convert fluorescence data into units of Chl *a*. In addition, as the FP's fluorometry-based method measures fluorescence, Chl *a* concentration is estimated from physiologically-active cells and is independent of the physiological status of the cells, which may be active, senescent and/or lysed. The physiological status of cells can also affect their pigment content and fluorescence (MacIntyre *et al.*, 2010). Furthermore, HPLC analysis usually yields lower Chl *a* concentrations than spectrophotometric or fluorometric methods, due to allomers and other chlorophyll derivatives that are detected as Chl *a* in spectrophotometric and fluorometric methods but separated chromatographically by HPLC (Jeffrey *et al.*, 1997).

Looking at the relationships between phytoplanktonic groups given by the FP measurements and HPLC analysis, correlations were highly significant on the 'browns' group and weakly significant on the 'blues' and 'greens' groups, especially with the *in vivo* strategy, consistently with the literature (Richardson *et al.*, 2010; Catherine *et al.*, 2012). In fact, Diatomophyceae and Dinophyceae are well represented and often dominated marine waters (Estrada *et al.*, 1999; Ribera d'Alcala *et al.*, 2004; Charles *et al.*, 2005; Thyssen *et al.*, 2011) and lagoon waters (Ayadi *et al.*, 2004; Bec *et al.*, 2011a; Caric *et al.*, 2011) in this Mediterranean coastal region. Cyanophyceae were found in marine shallow basin or lagoon

in concentrations ranges that varied strongly with environmental factors (Charles *et al.*, 2005; Chomérat *et al.*, 2007). Chlorophyta and cryptophyta tended to dominate, especially in fresh waters (Gregor & Maršálek, 2004; Catherine *et al.*, 2012) compared to marine waters (Thyssen *et al.*, 2011). Our data also confirmed the misattribution toward the 'red' group reported in earlier literature (Beutler *et al.*, 2004; Catherine *et al.*, 2012).

The cause of these low and/or inexistent correlations between FP data and HPLC analysis (for "greens", "blues" and "reds" groups) could stem from the heterogeneity of phytoplankton communities (marine and lagoon waters with different species) and the fact that the probe was used factory-calibrated (species and CDOM concentrations). Correlations could be enhanced by calibrating with species representative of the region (Richardson *et al.*, 2010) and by factoring in CDOM concentrations (Lawrenz *et al.*, 2010). Such enhancements proved difficult here due to the heterogeneity of our (marine and lagoon) phytoplankton communities. Indeed, comparisons of the FP dataset against HPLC analysis may sometimes be skewed by the non-specificity of some pigments for phytoplankton taxonomic compositions (Richardson *et al.*, 2010).

Nevertheless, a strong correlation coefficient can only be expected if the range of concentrations is higher than the expected range of F^{Chl} variability (MacIntyre *et al.*, 2010). Accordingly, studies on low biomass samples (oligo- to mesotrophic continental or marine systems) generally present lower correlation coefficients (MacIntyre *et al.*, 2010). Our dataset presents a larger number of measurements on low concentrations corresponding to the detection threshold of the FP, as shown in Table IV.2, with concentrations lower than $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ for Chl *a*, $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ for Diatomophyceae and Dinophyceae, $2.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ for Cyanophyceae, $10.1 \mu\text{g.L}^{-1}$ for Chlorophyta, and not determined for Cryptophyta. The range concentrations for Cyanophyceae and Chlorophyta are low in marine environments (oligotrophic waters), compared to recorded values in lagoon waters.

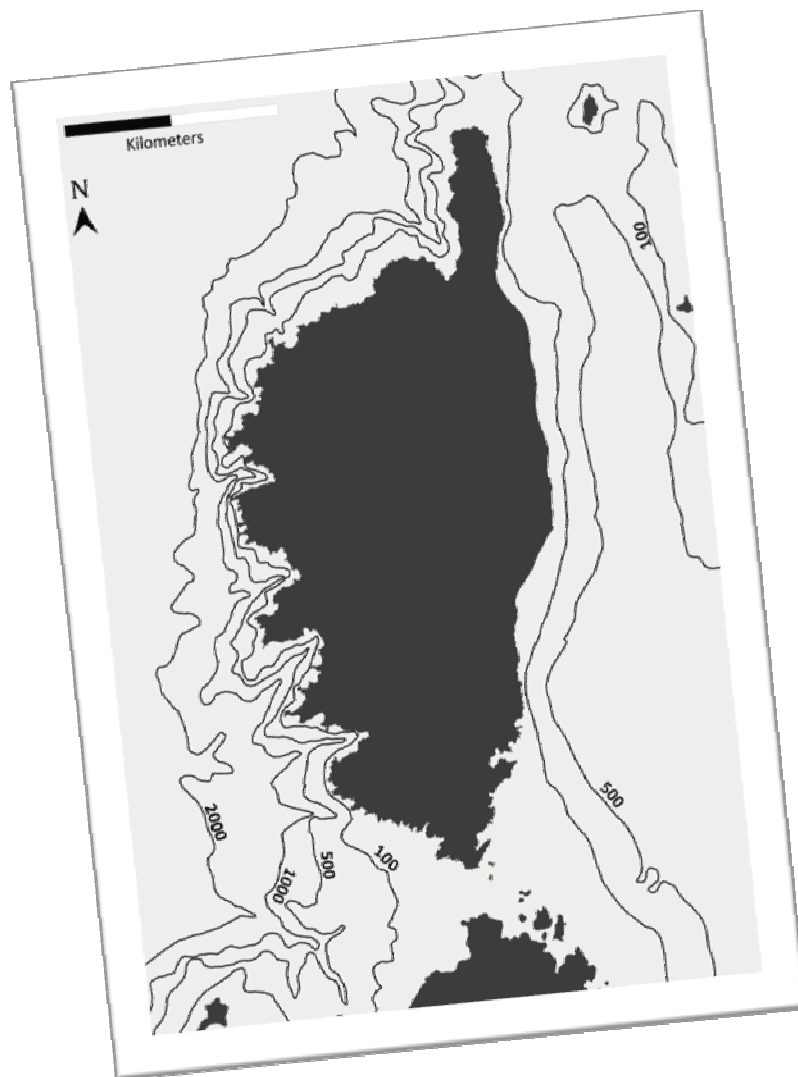
Even if it is difficult to compare *in vivo* versus *in situ* FP measurements due to their different sampling frames (different range concentrations), for all the relationships established between HPLC analysis and FP data, our correlations were always higher with *in vivo* FP data than *in situ* FP data. In fact, the comparisons between *in vivo* FP measurements

and HPLC analysis were realized with the same water sampling scheme (1 L of water), while *in situ* FP measurements integrated water heterogeneity. The measure with *in situ* FP is more representative of the *in situ* variability of phytoplankton.

In summary, our results show that the FluoroProbe, without specific calibration, provides good estimates of phytoplankton biomass (expressed in terms of Chl *a*) and phytoplankton community composition (Cyanophyceae, Chlorophyta, Diatomophyceae and Dinophyceae) for large-scale surveys of marine and lagoon environments. The FluoroProbe could be a useful phytoplankton monitoring tool, especially as an early warning system for the detection of harmful algal blooms in marine and lagoon waters that often present low phytoplankton biomass in marine Mediterranean environments. Taken together, our results suggest the FluoroProbe could be used for long-term Water Framework Directive monitoring on phytoplankton communities, as it offers higher temporal resolution than classical HPLC analysis. However, the lack of ability and information on some groups points to the need to couple the FluoroProbe with optical microscopy in order to identify dominant and sub-dominant species, as is already the case with HPLC analysis. Current data supporting the use of the FluoroProbe for studying phytoplankton community dynamics has to be completed by other measurements in marine and lagoon waters and by a larger range of community compositions than encountered in this study in order to accurately confirm relationships between phytoplankton biomass, phytoplankton community composition and HPLC analysis.

CHAPITRE V

Variability of phytoplankton communities in two contrasting coastal ecosystems in relation to environmental factors (Corsica, NW Mediterranean Sea)



Ce chapitre fait l'objet d'un article soumis (Garrido M., Goffart A., Collignon A., Hecq J.H., Agostini S. Marchand B., Lejeune P., Pasqualini V.) dans une revue internationale indexée au *Journal Citation Reports (Mediterranean Marine Science)*.

V.1. Introduction

The Mediterranean Sea (MS) is a semi-enclosed sea with a narrow continental shelf. The combined effects of low precipitation, relatively little river inflow of fresh water and strong evaporation produce a water balance deficit, resulting in high salinity and high temperatures (Béthoux *et al.*, 1999). With its low nutrient availability, the MS is ranked as an oligotrophic-to-ultraoligotrophic system (Krom *et al.*, 1991). These characteristics, added to the division of the Western Mediterranean Basin (WMB) into several sub-basins or seas, themselves separated by channels (e.g. Corsica channel), have an important influence on the currents but also on biotic and abiotic water mass parameters (Millot, 1999). The structure and succession of phytoplankton communities are primarily controlled by hydrodynamics and are dependent on nutrient availability, light, temperature, weather conditions, and grazing pressure (Richardson *et al.*, 1983; Anderson *et al.*, 1994).

In the WMB, the vertical structure of the water column shows strong seasonality, characterized by alternating periods of mixing and stratification. This fluctuation generates major changes in the average irradiance experienced by phytoplankton and in nutrient concentrations, modulating phytoplankton dynamics in terms of both community structure and productivity. Phytoplankton blooms occur in winter-spring, when the surface waters begin to stabilize (Estrada, 1991; Estrada *et al.*, 1999; Goffart *et al.*, 2002) and occasionally in autumn if wind events and lower surface-water temperatures combine to trigger a thermocline breakdown (Zingone *et al.*, 1995; Estrada, 1996; Andersen & Prieur, 2000; Vilicic *et al.*, 2007). Large-size high-growth-rate Diatomophyceae are generally found during these periods (e.g. *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Thalassiosira* ; Travers, 1971; Estrada *et al.*, 1999; Charles *et al.*, 2005). While this seasonal pattern of spring bloom and autumn bloom is found throughout the MS, it occurs in different shades according to coastal ecosystem study sites (Table V.I). Recent studies in marine littoral ecosystems highlight a strong heterogeneity of phytoplankton distribution at WMB scale, with high biomass concentrations in some areas ($\geq 3 \mu\text{g.L}^{-1}$; Jamet *et al.*, 2005; Polat *et al.*, 2005; Vilicic *et al.*, 2007; D'Ortenzio & Ribera d'Alcalà, 2009; Siokou-Frangou *et al.*, 2010; Gohin, 2011).

Table V.1. A non-exhaustive inventory of phytoplankton variation in marine littoral ecosystems (NW Mediterranean Sea).

Study sites	References	Study periods	Periods of high biomass	Dominant taxonomic groups
Catalan coast (Spain)	Estrada <i>et al.</i> , 1999	Winter	- February/March	- Diatoms (<i>Chaetoceros</i> sp, <i>Detonula pumila</i>)
Banyuls-sur-Mer (France)	Jacques, 1968	Annual cycle	- February - April/ May	- Diatoms (<i>Skeletonema costatum</i>) Cryptophytes - Diatoms (<i>Chaetoceros</i> sp, <i>Nitzschia</i> sp, <i>Rhizolenia delicatula</i>)
	Charles <i>et al.</i> , 2005	Annual cycle	- Autumn - March/April - Summer	- Diatoms - Diatoms (<i>Chaetoceros</i> sp, <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> , <i>Rhizolenia</i> sp), Dinoflagellates (<i>Prorocentrum</i> sp, <i>Protoperidinium</i> sp) - Diatoms (<i>Leptocylindrus</i> sp), Dinoflagellates (<i>Ceratium</i> sp, <i>Gyrodinium</i> sp, <i>Gymnodinium</i> sp, <i>Heterocapsa</i> sp), Cyanobacteria (<i>Synechococcus</i> sp, <i>Prochlorococcus</i> sp)
Marseilles (France)	Travers, 1971	Annual cycle	- February - March/May - Autumn	- Diatoms (<i>Skeletonema costatum</i> , <i>Chaetoceros</i> sp, <i>Rhizolenia stolterfothii</i>) - Diatoms (<i>Skeletonema costatum</i> , <i>Chaetoceros curvisetus</i> , <i>Lauderia annulata</i>) - Diatoms (<i>Skeletonema costatum</i> , <i>Leptocylindrus danicus</i> , <i>Thalassionema nitzschioides</i> , <i>Thalassiothrix frauenfeldii</i>)
	Thyssen <i>et al.</i> , 2011	Summer		- Diatoms, Cryptophytes, large Dinoflagellates
Toulon (France)	Jamet <i>et al.</i> , 2005	Annual cycle	- February/April - June - Autumn	- Diatoms (<i>Cyclotella</i> sp, <i>Navicula</i> sp, <i>Licmophora gracilis</i> , <i>Coscinodiscus</i> sp) - Dinoflagellates (<i>Prorocentrum compressum</i> , <i>Gymnodinium</i> sp) - Diatoms (<i>Navicula</i> sp, <i>Coscinodiscus</i> sp, <i>Chaetoceros</i> sp, <i>Cylindrotheca closterium</i> , <i>Cyclotella</i> sp)
Villefranche-sur-Mer (France)	Bustillos-Guzman <i>et al.</i> , 1995	Annual cycle	- March/April - November	- Prymnesiophyceae, Chrysophyceae - Diatoms
	Gomez & Gorsky, 2003	Annual cycle	- May - August/September	- Dinoflagellates (<i>Ceratium furca</i> , <i>Prorocentrum micans</i> , <i>Prorocentrum</i> sp) - Diatoms (<i>Thalassionema frauenfeldii</i> , <i>Dictyochophyceae</i> (<i>Dictyocha fibula</i>))
	Marty <i>et al.</i> , 2008	Summer/ Autumn	- October/November	- Diatoms (<i>Chaetoceros</i> sp) - Diatoms (<i>Dactyliosolen fragillissimus</i> , <i>Leptocylindrus danicus</i> , <i>L. minimus</i>) Prymnesiophyceae, Pelagophyceae
Naples (Italy)	Carrada <i>et al.</i> , 1980	Annual cycle	- May/June - October	- Diatoms (<i>Cylindrotheca closterium</i> , <i>Chaetoceros compressus</i> , <i>Nitzschia longissima</i>) - Dinoflagellates, Dictyochophyceae (<i>Emiliana huxleyi</i>)
	Zingone <i>et al.</i> , 1995	Autumn	- Winter	- Dictyochophyceae (<i>Emiliana huxleyi</i>)
	Ribera d'Alcala <i>et al.</i> , 2004	Annual cycle	- November - Winter/Early spring - Summer - Autumn	- Diatoms (<i>Thalassiosira</i> sp, <i>Chaetoceros</i> sp) - Diatoms (<i>Chaetoceros compressus</i> , <i>C. didymus</i> , <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> , <i>Thalassionema bacillaris</i>) - Diatoms (<i>Skeletonema pseudocostatum</i> , <i>Chaetoceros tenuissimus</i> , <i>C. socialis</i>) Dinoflagellates (<i>Heterocapsa niei</i> , <i>Prorocentrum triestinum</i>) - Diatoms (<i>Thalassiosira rotula</i> , <i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> , <i>Cylindrotheca closterium</i> , <i>Skeletonema menzeli</i> , <i>Dactyliosolen phuketensis</i> , <i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> , <i>Leptocylindrus minimus</i>), Dictyochophyceae (<i>Emiliana huxleyi</i>)

Nutrient inputs can be of natural origin (e.g. temperature, rainfall, hydrodynamics; Bustillos-Guzman *et al.*, 1995; Andersen *et al.*, 2001; Fouilland *et al.*, 2001; Goffart *et al.*, 2002) or anthropogenic origin (e.g. eutrophication; Vidal & Duarte, 2000; Béthoux *et al.*, 2002). In some areas or periods (divergence zones), nutrient contributions by hydrodynamic forcing in the euphotic zone act on phytoplankton population dynamics (Goffart *et al.*, 1995; Pinazo *et al.*, 2001; Fouilland *et al.*, 2001; Spatharis *et al.*, 2007). Phytoplankton is considered a key water quality element for coastal ecosystems in many studies and is the only planktonic element referred to in the Water Framework Directive (WFD). Scientists are working on establishing fast, robust and reproducible WFD indices to enable environmental managers to assess the quality of their water masses (Spatharis & Tsirtsis, 2010). This simplification hinges on pinpointing the functional dynamics and specific characteristics of the coastal areas studied. Our study is part of this research framework.

Corsica Island is the third largest island in the WMB, with 1 047 km of coastline that is unaffected by strong anthropogenic perturbation and pollution. The topography of the submerged part presents strong vertical asymmetry (Figure V.1). The West coast of Corsica is characterized by a narrow continental shelf and a succession of clearly-marked canyons creating an area located more than 2 500 m deep. The East coast has a sandy plain with a gentle slope emerging into shallow areas. The 200 m isobath is far from the shore, and depths seldom exceed 500 m, resulting in a fairly straight coast (Figure V.1). Corsica Island, from its geographical position, is in a “crossroads” climate, subject to a Mediterranean climate with summer aridness, high brightness, and uneven rainfall, especially in spring when precipitation is frequently sudden and abundant. Winds are all directed towards the island, the most important being southwesterly and northwesterly winds. The distribution of streams and lagoons is also conditioned by the morphology of the island, localized to the main lagoons on the East coast (e.g. Biguglia).

This study set out to characterize phytoplankton assemblages in two contrasting coastal ecosystems (Corsica Island) over one year using microscopy and pigment analysis. These two coastal ecosystems differ in terms of oceanographic conditions (frontal structure with significant depths, West coast and sandy plains with depth not exceeding 500 m and

nearly a lagoon environment, East coast; Figure V.1) and environmental conditions (climate forcing, physical conditions, nutrient availability...). Data on the spatio-temporal distribution of phytoplankton communities around Corsica remain scarce. Phytoplankton in the area of the Bay of Calvi has been widely investigated (Goffart, 1992; Goffart *et al.*, 1995; Goffart *et al.*, 2002). These earlier studies have helped improve knowledge on the spatio-temporal dynamics of phytoplankton communities in coastal areas with regional and local specificities.

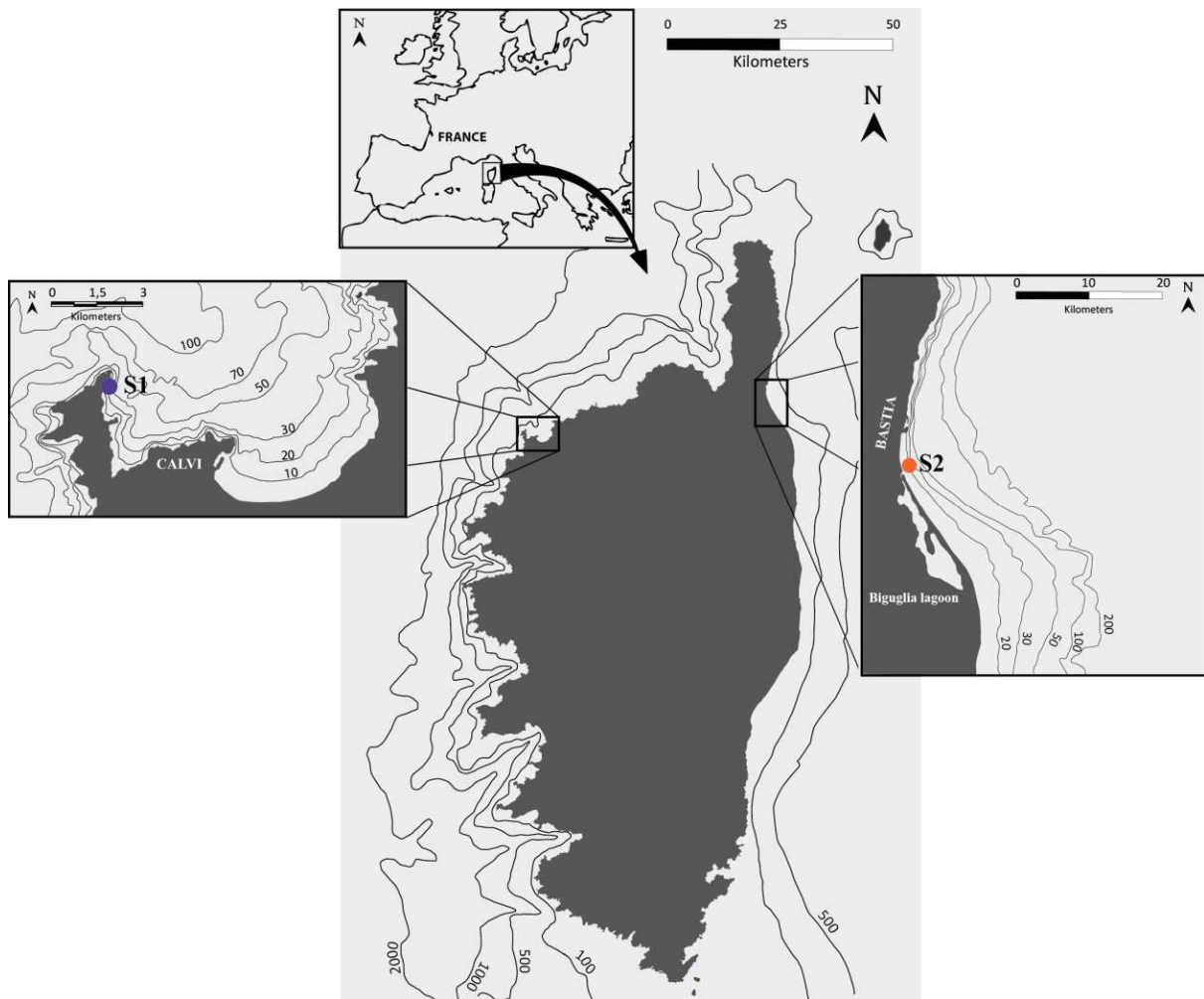


Figure V.1. Location of Corsica Island, representation of the vertical asymmetry in bathymetric profile, and maps of the study areas giving station locations (SHOM map Western Mediterranean).

V.2. Materials and methods

V.2.1. Sampling strategy

We chose two stations, one on each coast in Corsica, to compare two contrasting coastal ecosystems (Figure V.1). The first station is located in Calvi [S1, near the coast ($42^{\circ}34'50''\text{N}$, $08^{\circ}43'28''\text{E}$)] and is representative of the Bay (unpublished data), and the

second station is located in Bastia [S2 (42°38'12"N, 09°27'15"E); Figure V.1], at 1 km offshore with 20 m depth where the bottom is made of fine sand. Near the Bastia sampling station is the widest wet zone of Corsica: Biguglia. Sampling strategy was the same at both stations (S1 and S2), with monthly sampling during an annual cycle in 2010. Beker *et al.* (2001) demonstrated that sampling frequency for studies on phytoplankton dynamics in coastal areas needs to be around a sample every 15 days to capture sudden changes in phytoplankton populations. It is for this reason that in the Bastia area, where to our knowledge phytoplankton dynamics have never yet been studied, we increased the sampling frequency. The sampling strategy consisted in weekly sampling for five months (January to May) on another station in Bastia near the coast (42°40'53"N, 09°26'51"E) in order to accurately track in-station phytoplankton dynamics during this period of strongest change in annual variation. Water samples for all analyses were collected from the subsurface between 7:00 and 8:30 am (local time) in all stations.

V.2.2. Physico-chemical measurements

Temperature and salinity were measured at each sampling station in the subsurface, using two multiparameter probes (Seabird SBE19 and YSI EMS, 6600 V2-2). Meteorological data for 2010 (rainfall, daily precipitation in mm; wind, weekly average wind strength in m/s and atmospheric temperature) came from Météo-France data recorded at the weather stations at Bastia and Calvi airports.

Water samples for the determination of nutrients (nitrate and silicate) were collected in 20 mL polyethylene flasks and stored at -20 °C until in-lab analysis, which was performed on a Technicon AutoAnalyzer II (precision ± 25 nM) as in Tréguer and Le Corre (1975).

V.2.3. Phytoplankton analysis

In order to identify and quantify the phytoplankton samples, 50 L of water was filtered through a silk Apstein 20 μ m-screen plankton net, and 100 mL was recovered and fixed with 2.5 % formaldehyde solution. All samples were stored at room temperature in the dark until analysis. Using an inverted microscope, we examined each sample using the Utermöhl method (Utermöhl, 1958; AFNOR, 2006). Numeration at 200x and 400x magnification was carried out on diametric tapes or on the total chamber surface depending

on species size and abundance (Lund *et al.*, 1958). When possible, 400 cells were counted to ensure that the error in estimation of cellular abundance remains within the limits of $\pm 10 \%$ (Uehlinger, 1964).

For pigment analysis, 1 L of water was collected and prefiltered through a 200 μm mesh screen to remove mesozooplankton. Water samples were filtered on 25 mm Whatman GF/F glass fiber filters. The filters were frozen (-20°C) and analyzed by HPLC. Samples were extracted in methanol using sonication (Jeffrey *et al.*, 1997). Pigment extracts were analyzed by HPLC (Waters Alliance 2695) according to the technique of Zapata *et al.* (2000). This study used the pigments as size-class markers of phototroph groups (Sieburth *et al.*, 1978). The biomass proportion associated with each size class is defined according to the method described in Claustre (1994), completed by Vidussi *et al.* (2001; for a detailed description of this pigment index, see Vidussi *et al.*, 2001).

V.2.4. Zooplankton analysis

The mesozooplankton samples were collected monthly using a standard 200- μm mesh-size wp2 net at the S1 (Calvi) and S2 (Bastia) stations. The trawl sampled between 0 and 5 m of the sea subsurface at an average speed of 2 km.h^{-1} during 20 min for each sample. Water volume filtered was 188 m^3 . Before transferring the samples from the collector to the jar, the net was washed to collect all plankton trapped in the mesh. The samples were then reduced to a volume of 200 mL and fixed in 2.5 % formalin. Mesozooplankton biovolume was measured after 24 h of sedimentation in graduated cylinders. The results are expressed in mL per m^3 .

V.2.5. Statistical analysis

All data were analyzed using two statistical software packages: Statgraphics® Plus V2.1 and XLStat® V2011 5.01. Data were first tested for homogeneity of variances (Bartlett's test) and normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test). A Student's *t*-test was then used to determine the relationship between the different measured variables. When the distributions of the data were not normal even after logarithmic transformation, nonparametric tests of median comparisons were performed (Kruskal-Wallis).

V.3. Results

V.3.1. Phytoplankton variation and structure

The sampling strategy in Bastia (weekly and monthly samplings over 5 months on two stations) found showed the same patterns in the parameters measured (data not shown) and the same phytoplankton communities during the period for the both stations in Bastia area, although with lower abundances at the station nearest the coast.

In S1 (Calvi station), subsurface Chl *a* concentrations varied from 86.9 to 1815.2 ng.L⁻¹ (Figure V.2). Subsurface Chl *a* concentrations were only high in March (1815.2 ng.L⁻¹). Chl *a* concentrations were low during the other months (monthly average except March: 290.2 ng.L⁻¹), but increased slightly from November. In S2 (Bastia station), subsurface Chl *a* concentrations varied from 100.3 to 2143.4 ng.L⁻¹ during the annual cycle (Figure V.2). Compared to S1, two distinct periods were observed: Chl *a* concentrations were high between January and May (up to 2143.4 ng.L⁻¹ in May) and low during the rest of the year (June to December; monthly average of 291.0 ng.L⁻¹), increasing from October (Figure V.2). Chl *a* concentrations differed significantly on the two stations (Spearman Rank Coefficients, $P < 0.01$).

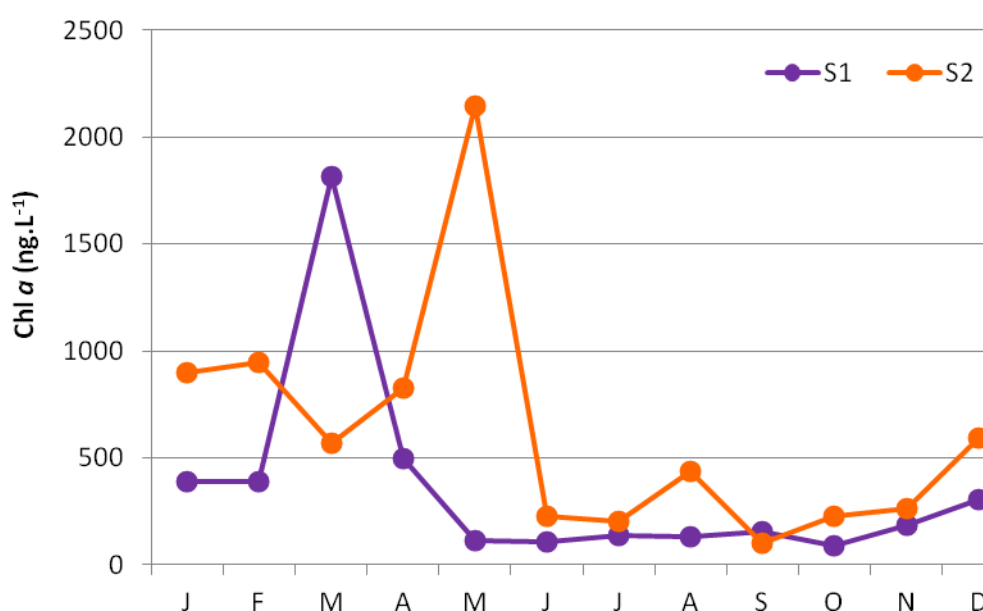


Figure V.2. Spatio-temporal subsurface Chl *a* variation during 2010 at two stations (S1 and S2).

The spatio-temporal variability of Chl *a* concentrations was associated to characteristic compositions on each station. In S1, picophytoplankton biomass dominated in subsurface waters (with an annual mean of 50 % and a biomass of 140.0 ng.L⁻¹; Figure V.3), associated with zeaxanthin (Figure V.4; 29.3 % of all pigments, data not shown).

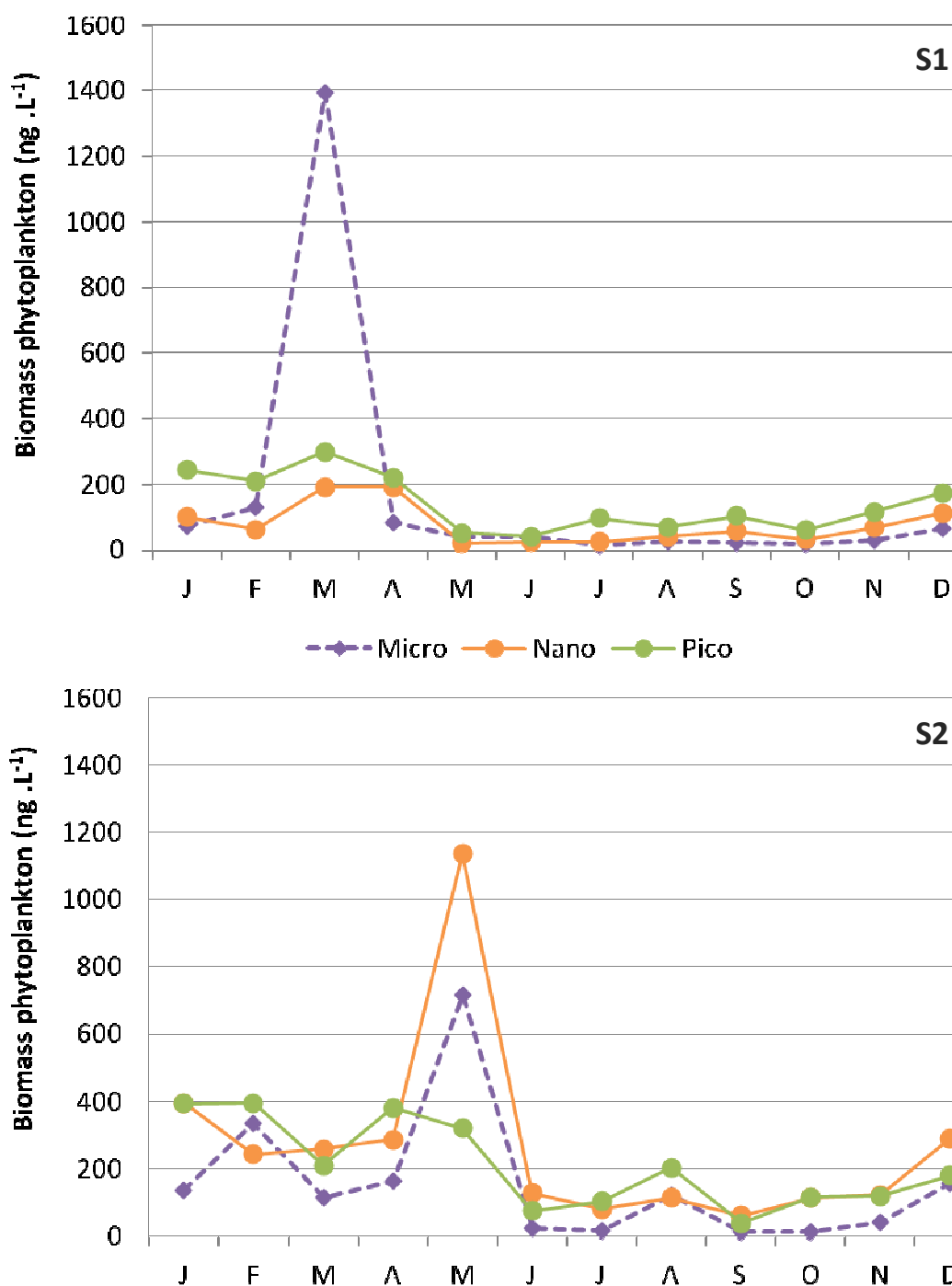


Figure V.3. Spatio-temporal variability of biomass size classes for micro-, nano- and picophytoplankton according to the equation of Vidussi *et al.* (2001).

High microphytoplankton concentrations, at 74 % proportion or 1391.1 ng.L^{-1} (Figure V.3), were only detected in March, and were associated with high fucoxanthin concentrations (Figure V.4; 59 % proportion of all pigments, data not shown). In S2, biomass was dominated by wide range of size classes during the first period (January to May; Fig V.3). Nanophytoplankton biomass dominated in subsurface waters (with an annual mean of 43 % and a biomass of 268.6 ng.L^{-1} ; Figure V.3), associated with 19'-hexanoyloxyfucoxanthin (Figure V.4; 32.1 % proportion of all pigments, data not shown). Microphytoplankton were only found in February and in May (34 % or 334.4 ng.L^{-1} and 33 % or 714.3 ng.L^{-1} , respectively; Figure V.3), and marked by high fucoxanthin concentrations in February (Figure V.4; 27 % proportion of all pigments, data not shown).

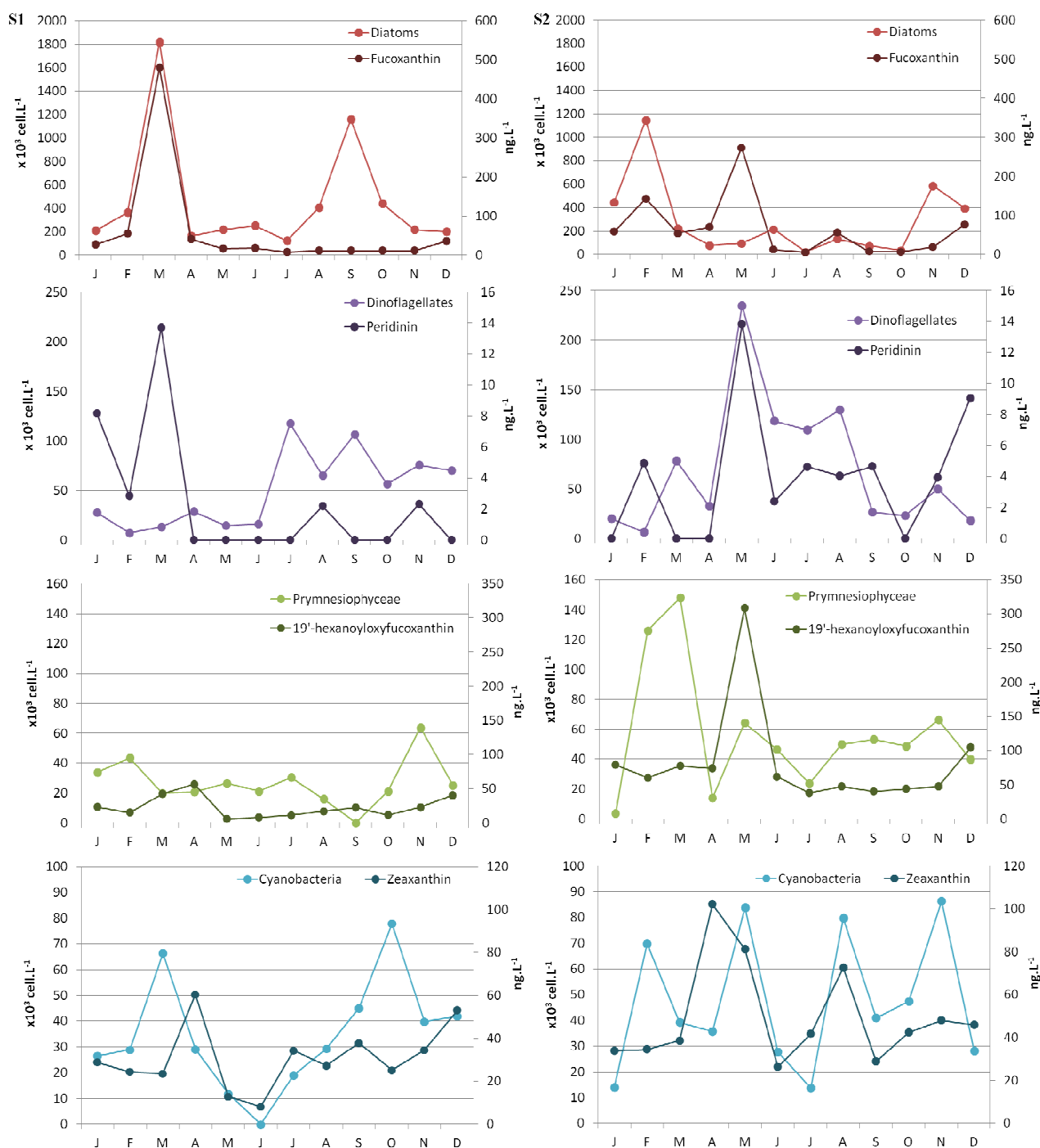


Figure V.4. Spatio-temporal evolution of the principal classes of phytoplankton and the specific pigment corresponding at S1 and S2.

Microscopy observations confirmed that the early spring bloom in each station (March in S1 and February/May in S2; Figure V.4) could be largely attributed to the presence of large phytoplankton cells consisting mainly of chromophytes dominated by *Chaetoceros* sp Diatomophyceae (up to $776 \times 10^3 \text{ cell.L}^{-1}$ in S1 in March and up to $275 \times 10^3 \text{ cell.L}^{-1}$ in S2 in February; Table V.2). Microscopy also revealed the occurrence of *Licmophora* sp blooming in

winter-spring in S1 (up to 149×10^3 cell.L⁻¹ in February) and *Thalassionema* sp in S2 (128×10^3 cell.L⁻¹; Table V.2). Dinophyceae were mainly represented, in July for S1 and during May to August for S2. The diversity of genera encountered was greater in S2, with *Ceratium furca* (in spring and in summer), *Prorocentrum* sp and *Protoperdinium* sp (in spring). *Dinophysis* sp was present occasionally in S2. Prymnesiophyceae were also found at various concentrations. Numerous colonial cells of *Phaeocystis* sp were present all year long but especially April/May in S1 (Table V.2 and Figure V.4).

Table V.2. Spatio-temporal characterization of phytoplankton communities in S1 and S2 stations
(Ø no dominant taxonomic groups).

Months	Dominant taxonomic groups
S1 (Calvi)	
January	Diatomophyceae (<i>Licmophora</i> sp)
February	Diatomophyceae (<i>Licmophora</i> sp)
March	Diatomophyceae (<i>Chaetoceros</i> sp)
April	Diatomophyceae / Prymnesiophyceae (<i>Phaeocystis</i> sp)
May	Diatomophyceae
June	Ø
July	Dinophyceae / small Diatomophyceae
August	Diatomophyceae
September	Diatomophyceae
October	Diatomophyceae
November	Diatomophyceae (<i>Coscinodiscus</i> sp)
December	Diatomophyceae
S2 (Bastia)	
January	Diatomophyceae (<i>Chaetoceros</i> sp, <i>Thalassionema</i> sp)
February	Diatomophyceae (<i>Chaetoceros</i> sp)
March	Dictyochophyceae (<i>Dictyocha</i> sp) / Prymnesiophyceae / Diatomophyceae
April	Diatomophyceae
May	Dinophyceae (<i>Ceratium furca</i> , <i>Prorocentrum</i> sp)
June	Small Diatomophyceae / Dinophyceae
July	Dinophyceae (<i>Ceratium furca</i>) /Prymnesiophyceae
August	Diatomophyceae / Dinophyceae / Cyanophyceae
September	Prymnesiophyceae / Diatomophyceae
October	Prymnesiophyceae / Cyanophyceae
November	Diatomophyceae (<i>Chaetoceros</i> sp, <i>Leptocylindrus</i> sp)
December	Diatomophyceae

In S2, *Syracosphaera* sp was encountered in spring and summer, while *Rhabdosphaera* sp was found mostly in summer and autumn. The Diatomophyceae *Coscinodiscus* sp in S1 in November and *Leptocylindrus* sp and *Chaetoceros* sp in S2 in November were found to be associated with upper water column freshening events. Most of the pico- and nanophytoplanktonic cells appeared as rounded forms lacking discriminating morphological characters, making it impossible to identify them.

V.3.2. Zooplankton variation

The zooplankton cycle, expressed from biovolumes sedimented, also showed seasonal fluctuations in S1 (0.05 to 0.82 mL.m⁻³; Figure V.5) and S2 (0.02 to 0.48 mL.m⁻³). Peak values were recorded in April in both stations.

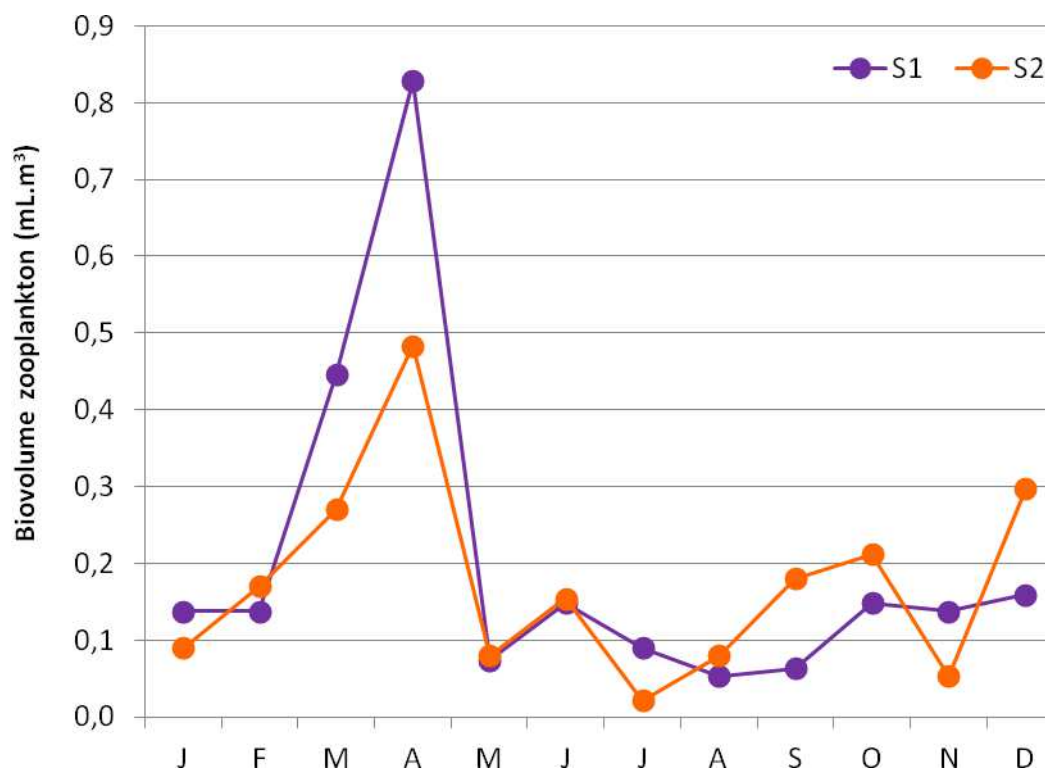


Figure V.5. Spatio-temporal variations in zooplanktonic biovolume at S1 and S2 stations over the annual cycle.

We found a correlation between Chl *a* concentration variations and zooplanktonic biovolume (data not shown), specifically between fucoxanthin variation (Diatomophyceae-specific marker) and zooplankton abundance at both stations (Figure V.6). Zooplankton communities succeeded phytoplankton communities. A lag of about one month was observed between the abundance of larger zooplankton and fucoxanthin (Figure V.6).

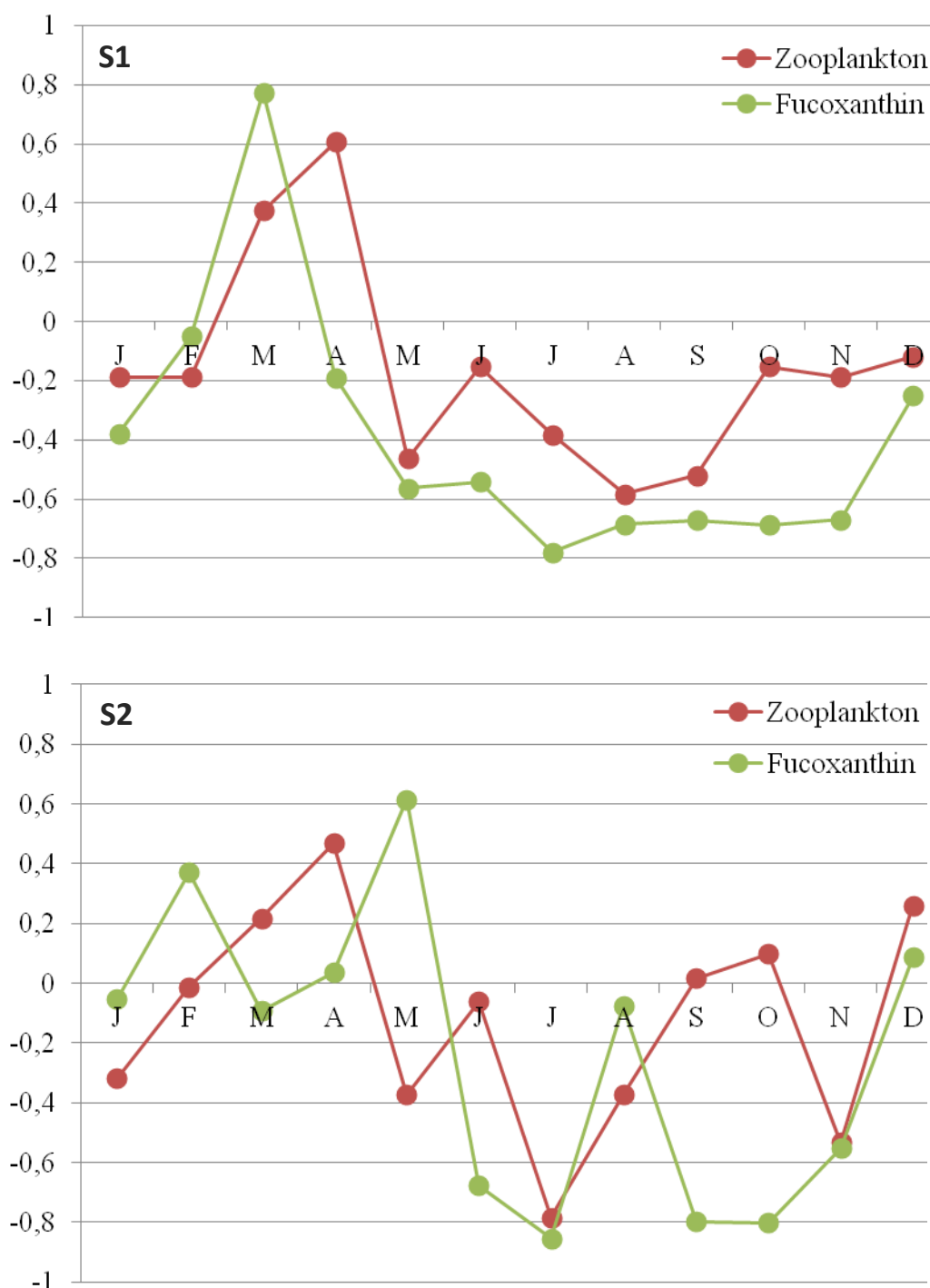


Figure V.6. Relative data on zooplanktonic biovolume and fucoxanthin (specific marker pigment of Diatomophyceae) in S1 and S2 stations during the annual cycle.

V.3.3. Physico-chemical parameters

From January to May, all physical parameters showed no significantly different variation in the two stations in Bastia area ($P > 0.05$, Student's t -test; data not shown). The *in situ* temperature probed at the subsurface followed a logical seasonal pattern with a gradual

increase during summer, and was similar between S1 (Calvi) and S2 (Bastia; $P > 0.05$, Kruskal-Wallis), ranging from 12.4 °C to 26.3 °C in S1 and 12.6 °C to 26.4 °C in S2 (Table V.3). S1 subsurface salinity remained fairly unchanged (37.7-38.4) all year long. In S2, low subsurface salinity revealed that two freshening events occurred in March and in November, when surface salinities fell to 36.7 and 36.9, respectively. Rainfall over 2010 was significantly different on the two coasts, with an annual average of 74.9 in S1 and 86.2 mm in S2 ($P < 0.05$, Student's *t*-test). In S1, major rainfall events were recorded between September to December (429.8 mm against 278.1 mm in S2), while in S2, precipitations were heavier during the winter-spring period (January to June, 734.1 mm against 451.7 mm in S1). Wind episodes were more numerous and more intense in Calvi compared to Bastia (1.0 to 7.3 m.s⁻¹ in S2 *versus* 1.3 to 9.3 m.s⁻¹ in S1; $P < 0.001$, Student's *t*-test). Winds were southwesterly almost all year round in S1 (windspeed up to 13.7 m.s⁻¹ in February), while in S2, winds switched between southwesterly and southeasterly (windspeed up to 10.9 m s⁻¹ in February).

Table V.3. Range values, mean values (μ) and standard deviation (σ) for environmental factors measured at the two stations S1 and S2.

Parameters	Calvi (S1)			Bastia (S2)		
	Range	μ	σ	Range	μ	σ
Temperature (°C)	1.9 - 30.1	15.8	6.4	2.5 - 27.0	15.6	6.2
Wind (m/s)	1.3 - 9.3	3.6	0.4	1.0 - 7.1	2.4	0.2
Rainfall (mm)	0.4 - 207.3	74,9	61.8	0.6 - 228.0	86,2	62.2
Water temperature (°C)	12.6 - 26.4	17.6	4.5	12.4 - 26.3	18.0	4.9
Salinity (PSU)	37.7 - 38.3	38.0	0.2	36.2 - 38.4	37.7	1.7

Nitrate and silicate concentrations showed seasonal variation, with the highest values recorded during winter-spring in both stations (Figure V.7). In S1 (Calvi), silicate concentrations were highest in March (2.07 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; Figure V.7), while subsurface nitrate concentrations ranged from low ($< 0.05 \mu\text{mol.L}^{-1}$) to 1.34 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ in February. In S2 (Bastia), subsurface nitrate concentrations ranged from very low ($< 0.05 \mu\text{mol.L}^{-1}$) up to 1.27 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ in June. Subsurface silicate concentrations were high in S2 during winter-spring, up to 32.09 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ in May, and similar at S1 from June to December, except August at 2.90 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

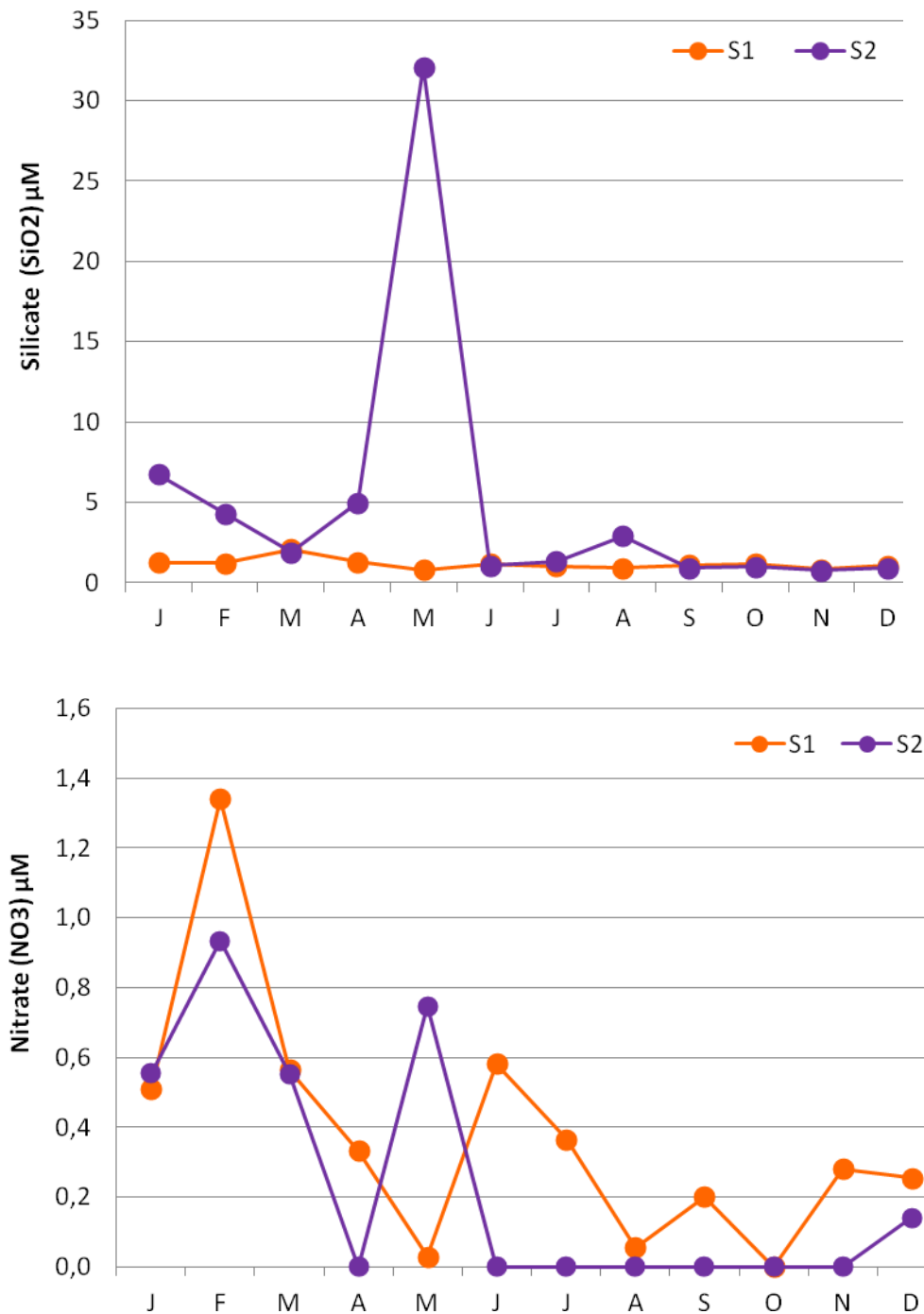


Figure V.7. Temporal variations in silicate and nitrate at S1 and S2 stations over the annual cycle.

V.4. Discussion

This study provides new data on the spatio-temporal variability of phytoplankton in coastal ecosystems in the Northwestern Mediterranean Sea. Margalef's theory of ecological succession in phytoplankton can be totally applied to coastal ecosystems (Margalef, 1958).

Phytoplankton communities in the MS are characterized by three annual succession phases that drive the pioneer winter populations to a final state by increasing the maturity of the system. The data interpretation of this study was separated into the annual variations of phytoplankton communities, i.e. (i) winter-spring bloom period, (ii) late-bloom and summer periods, and (iii) autumn period.

In the MS, the first phase generally occurs in winter (February-March) prior to the thermal stratification that is assumed to be the prerequisite for the “classical” spring bloom of temperate regions (Sverdrup, 1953). The biomass increase is recorded over the majority of the water column, generally involving large-size high-growth-rate Diatomophyceae (e.g. *Chaetoceros* sp, *Skeletonema* sp, *Thalassiosira* sp; Travers, 1971; Lévy *et al.*, 1998; Charles *et al.*, 2005). Indeed, the winter bloom has been defined as the unifying feature for phytoplankton in the Northwestern MS (Duarte *et al.*, 1999), where it has been recorded all along the coast (Table V.1). A similar situation was found during this research campaign in our two stations (S1 and S2). Chl *a* concentrations in the subsurface water during the winter-spring period presented high maximum values. These data are consistent with published variations for surface waters in winter-spring (Estrada, 1991; Delgado *et al.*, 1992; Estrada *et al.*, 1999; Ribera d’Alcala *et al.*, 2004; Mercado *et al.*, 2005; Siokou-Frangou *et al.*, 2010; Gohin, 2011). However, when we compared S1 and S2 stations over the first 5 months of the year (period involving the strongest variations), winter-spring conditions and phytoplankton dynamics clearly showed different patterns. In Calvi (West coast of Corsica), peak phytoplankton biomass was recorded in March, and Diatomophyceae dominated. In Bastia (East coast of Corsica), Chl *a* concentrations were high throughout the winter-spring period (January and May, monthly average: 1077.4 ng.L⁻¹). Diatomophyceae abundance was high in March, whereas nanophytoplankton dominated in other months. The peak biomass in May was represented by Dinophyceae. Given that Diatomophyceae are typical of well-mixed, nutrient-rich environments (Margalef, 1978), our results showed that coastal waters of Bastia (S2) were not always as well mixed as would be expected for Calvi and the Northwestern Mediterranean littoral zone (Agawin *et al.*, 1998; Agusti & Duarte, 2000). Indeed, in S1, the winter-spring period corresponded to vertical thermocline movement under the influence of local wind-driven upwelling events and the injection of nutrients through across-thermocline mixing induced by the Liguro-Provençal front. These data are

consistent with published phytoplankton variations at Calvi (Brohée *et al.*, 1989; Goffart *et al.*, 1995; Goffart *et al.*, 2002). In S2, the winter-spring period also corresponded to vertical thermocline movement and the injection of nutrients induced by rainfall during this period, the proximity of rivers and a lagoon environment (Biguglia). These local specificities could explain the high concentration of Chl *a* during a 5-month period and the low abundance of Diatomophyceae. Phytoplankton communities are selected by their tolerance to surrounding biotic and abiotic pressures (e.g. turbulence, pollution, predation) and by ability to compete for resources (Quinlan and Philips, 2006). Diatomophyceae are very sensitive to changing environmental conditions (Brayner *et al.*, 2011). The Biguglia lagoon is a confined ecosystem with increasing eutrophication since 1980 (Mouillot *et al.*, 2000). Inputs from brackish lagoon waters during winter-spring induced by strong rainfall events could explain why Diatomophyceae have not dominated in this coastal area and why Dinophyceae and nanophytoplankton, which cope better with changing environments, are found in higher numbers. As a primary producer, Diatomophyceae are key organisms in the water ecosystem (Brayner *et al.*, 2011). Moreover, they are beneficial to the higher trophic chain. Indeed, on our two stations, zooplanktonic herbivores appeared after the phytoplanktonic spring bloom. For the first phase, these results for the winter-spring period are consistent with earlier reports on coastal ecosystems in many Northwestern MS areas (Table V.1). On Catalan coastline with a deep basin near the frontal system (Catalan and North Balearic fronts), Estrada *et al.* (1999) found similar phytoplankton groups for the same study period compared to Calvi (S1), which is also subjected to a frontal system (the Liguro-Provençal front; Table V.1). The permanent frontal zone is a highly dynamic area, where a complex network of the divergences brings nutrients from deep water into the euphotic zone, thus enhancing new phytoplankton production (Estrada *et al.*, 1999; Goffart *et al.*, 2002). Areas with shallow basins show different ecological successions of phytoplankton communities, with high Chl *a* concentrations represented by large Diatomophyceae (March/April) and Dinophyceae (April/May), as in the Bastia station (S2) and in Banyuls-sur-mer (Charles *et al.*, 2005; Table V.1). The most striking impact was brought about by upper water column freshening as a result of river runoff, and to some extent local rainfall, which both freshened the surface water, changing its buoyancy and stability, and introduced fairly substantial amounts of nutrient (Charles *et al.*, 2005). These physical instabilities led to seasonal and vertical shifts in the supply and distribution of nutrients.

The second phase or late-bloom and summer periods were characterized by a decrease in nutrient intake and Chl *a* concentrations in both stations, consistently with published variations for oligotrophic surface waters for this period (Duarte *et al.*, 1999; Vidussi *et al.*, 2001; Gailhard *et al.*, 2003; Vilicic *et al.*, 2007). Chl *a* biomass was essentially dominated by pico- and nanophytoplankton, which contributed 75 % of total Chl *a* in Calvi and 81 % of the annual cycle in Bastia. Li (2002) showed that as a rule, a drop in Chl *a* concentration drives an increase in pico- and nanophytoplankton. This profile is similar to reports from Marty *et al.* (2008) and Bel-Hassen *et al.* (2009) in the western MS, where relative contributions for these size groups were about 85 %. A Dinophyceae bloom involving *Ceratium* and *Prorocentrum* genera and Cyanophyceae occurred in Bastia. In the same case in Banyuls-sur-mer, small Dinophyceae and Cyanophyceae were observed (Charles *et al.*, 2005; Table V.1). However, others areas of Northwestern MS have a similar assemblage structure but with a little more small Diatomophyceae (e.g. Naples; Table V.1). The summer phase is characterized by strong thermal stratification which leads to a 50 m-deep thermocline with low-level nutrients and low biological activity (Margalef, 1985; Marty *et al.*, 2008; Lasternas *et al.*, 2011). Here, nutrient concentrations (nitrate and silicate) in subsurface waters gradually deplete and virtually disappear as the season progresses, directly due to photosynthetic activity and the thermocline preventing nutrient upflow from deep water to the surface.

During the third phase, in autumn, phytoplankton diversity remained low, probably because less-competitive species were eliminated by the persistent post-summer oligotrophic conditions (Spatharis *et al.*, 2007). The dominance of picophytoplankton confirms the principle that small species are more competitive and abundant in nutrient-depleted conditions (Cloern & Dufford, 2005). Thermocline breakdown together with the effects of wind events and lower surface-water temperatures can sometimes lead to phytoplankton bloom (Zingone *et al.*, 1995; Estrada, 1996; Andersen & Prieur, 2000; Vilicic *et al.*, 2007). In Calvi and Bastia, in October, Chl *a* concentrations increased slowly and large Diatomophyceae appeared. However, Chl *a* concentrations were higher in S2, where enrichment resulted both from autumn rainfalls and exchanges with the lagoon environment. An ecologically important nutrient enrichment may also take place in autumn when rainfall events wash out domestic wastes that had accumulated during summer and

retained untreated in waterways (D'Ortenzio, 2003; Charles *et al.*, 2005). An extreme enrichment, occurring after intensive rainfalls in late winter, was rapidly exploited by a single potentially toxic species that dominated numerically, leading to a biomass peak, a drop in diversity, and potential HAB formation (Puigserver *et al.*, 2010).

On the basis of the investigations conducted so far in Corsica Island, the integration of physical and biological data has to be considered a prerequisite for an exhaustive understanding of the marine ecosystem dynamics in these coastal sites. Connections between climate and human activities make it difficult to detect and assess marine ecosystems responses, and for this reason we suggest that more effort should be devoted to these regional functions, including by promoting continuous monitoring of coastal areas. Comparing the structure of assemblages driven by anthropogenic nutrient inputs to the structure of assemblages following natural succession can provide vital insights into the rules governing phytoplankton community and assemblage responses to changes in environmental conditions.

CHAPITRE VI

Can water fluxes management improved structure and photosynthetic efficiency of the phytoplankton communities? A case study in an eutrophic coastal Mediterranean lagoon



Ce chapitre fait l'objet d'un article soumis (Garrido M., Cecchi P., Collos Y., Agostini S., Goffart A., Marchand B., Pasqualini V.) dans une revue internationale indexée au *Journal Citation Reports*.

VI.1. Introduction

Coastal lagoons are among the richest reservoirs of ecological diversity and biological productivity (Costanza *et al.*, 1997). They are of economic interest in sustaining many different ecosystem services (Nixon, 1982; Costanza *et al.*, 1997; Barbier *et al.*, 2011). Owing to their transitional location between continental and marine biota, coastal lagoons are subject to various environmental stresses that may induce deep spatiotemporal changes of their physical, chemical and biological conditions (Barnes, 1980; Day *et al.*, 2000; Cloern, 2001). Their variety in shapes and sizes results in a large diversity in terms of annual thermal regimes, of fresh water inflows and exchanges with the sea (Nixon, 1982). But coastal lagoons are also increasingly subject to growing anthropogenic pressures (Howarth *et al.*, 1996; Cloern, 2001): more than 40 % of the world's population are living today within 100 km of the coast and an even larger population is predicted within the next two decades (Martinez *et al.*, 2007; Duxbury & Dickinson, 2007). In parallel to these anthropogenic pressures, land use of watersheds exerts also a strong influence on Mediterranean coastal wetlands (Alvarez-Cobelas *et al.*, 2005; La Jeunesse *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2006). Eutrophication, by the over-enrichment of waters with nutrients, has been one of the major effects of human activity on aquatic ecosystems during the past 50 years (Nixon, 1995; Cloern, 2001). Coastal water quality, particularly lagoons, is currently in sharp decline (European Environment Agency, 1999; Rabalais *et al.*, 2009). The need remains for water and resource managers to reduce nutrient loads to reduce eutrophication and its associated negative effects and to prevent further degradation (Rabalais *et al.*, 2009). Some Mediterranean lagoons have been the subject of restoration approach to improve water quality and thus to fight against eutrophication, for example in Venezia lagoon (Italy; Bettinetti *et al.*, 1996), in Orbetello lagoon (Italy; Lenzi *et al.*, 2003), in Ter Vell (Spain; Badosa *et al.*, 2007), in Albufera of Valencia (Spain; Villena & Romo, 2003), and in Tunis lagoon (Tunisia; Ben Charrada, 1992; Jouini *et al.*, 2005). These actions target essentially to increase the water circulation and to decrease and/or to dilute the input of sewage in the lagoon. The processes of eutrophication and its impact on the quality and ecological functioning of the lagoons are well documented, notably on the primary producers (Barica &

Mur, 1980; Schramm, 1999; Smith *et al.*, 1999; Cloern, 2001; Anderson *et al.*, 2002; de Jonge *et al.*, 2002; Chomérat *et al.*, 2007; Collos *et al.*, 2009; Bec *et al.*, 2011a, b).

Primary producers play an important role in the flow of matter and energy through food webs in such environments that further support ecosystem services of high economic value (e.g. fishing, aquaculture; Nixon, 1986). The monitoring of functional groups and the use of life history traits are becoming more and more used for the understanding of the structure of phytoplankton communities along environmental gradients (Litchman *et al.*, 2007; Litchman & Klausmeier, 2008). Phytoplankton communities are very sensitive to changes in nutrient levels, but also to changes in light, temperature and salinity (Hecky & Kilham, 1988; Ayadi *et al.*, 2004; Quinlan and Phlips, 2006; Armi *et al.*, 2010; Drake *et al.*, 2010; Caric *et al.*, 2011). Ecophysiological properties of phytoplankton, as photosynthetic efficiency are also impacted by variations in lagoon environment (Fu *et al.*, 2007; Hancke *et al.*, 2008; Bartolomé *et al.*, 2009). The anthropogenic nutrient fluxes strongly influence the distribution and succession of phytoplankton communities along the gradient of eutrophication (Duarte, 1995; Schramm, 1999; Souchu *et al.*, 2010). The biomasses are particularly elevated in the most degraded or hypereutrophic lagoons ($>200 \mu\text{g.L}^{-1}$ Chl *a*; Frisoni *et al.*, 1984; Villena & Romo, 2003; Souchu *et al.*, 2010; Bec *et al.*, 2011a). They can also promote the development of potentially harmful phytoplankton species (Smith *et al.*, 1999; Laabir *et al.*, 2011). Phytoplankton communities are selected by their tolerance to surrounding biotic and abiotic pressures (turbulence, predation, parasitism...) and by their competition for resources (Legrand *et al.*, 2003; Quinlan & Phlips, 2006). The main phytoplankton groups adopt contrasting ecological strategies, associated with their biological traits (size, growth, nutrient uptake kinetics; Margalef, 1978; Collos, 1986). For the lagoons the most damaged, the phytoplankton community structure is disrupted, with a dominance of nano- and picophytoplankton (Bec *et al.*, 2011a). In most cases, Diatomophyceae grow preferentially when the temperature and salinity are low, while Dinophyceae are dominant when the temperature and salinity are high (Ayadi *et al.*, 2004; Caric *et al.*, 2011). Salinity has been suggested as being a controlling factor of Cyanophyceae and Dinophyceae blooms in estuaries (Bartolomé *et al.*, 2009). Natural blooms of *Prorocentrum minimum* have been in particular correlated with salinity (Mendez, 1993; Grzebyk & Berland, 1996; Heil *et al.*, 2005). Experimental studies have confirmed that this

species can grow over a broad salinity range 2-35 psu, but in exhibiting an optimal growth around 15-17 psu (Hajdu *et al.*, 2000).

The shallow lagoon of Biguglia (Corsica, Western Mediterranean Sea; Figure VI.1) is a confined ecosystem disturbed by a growing eutrophication since 1980, associated to agriculture intensification on its watershed and to tourism pressure, especially during summer (Frisoni & Dutrieux, 1992; Mouillot *et al.*, 2000; Orsoni *et al.*, 2001; Orsoni & Baldi, 2004).

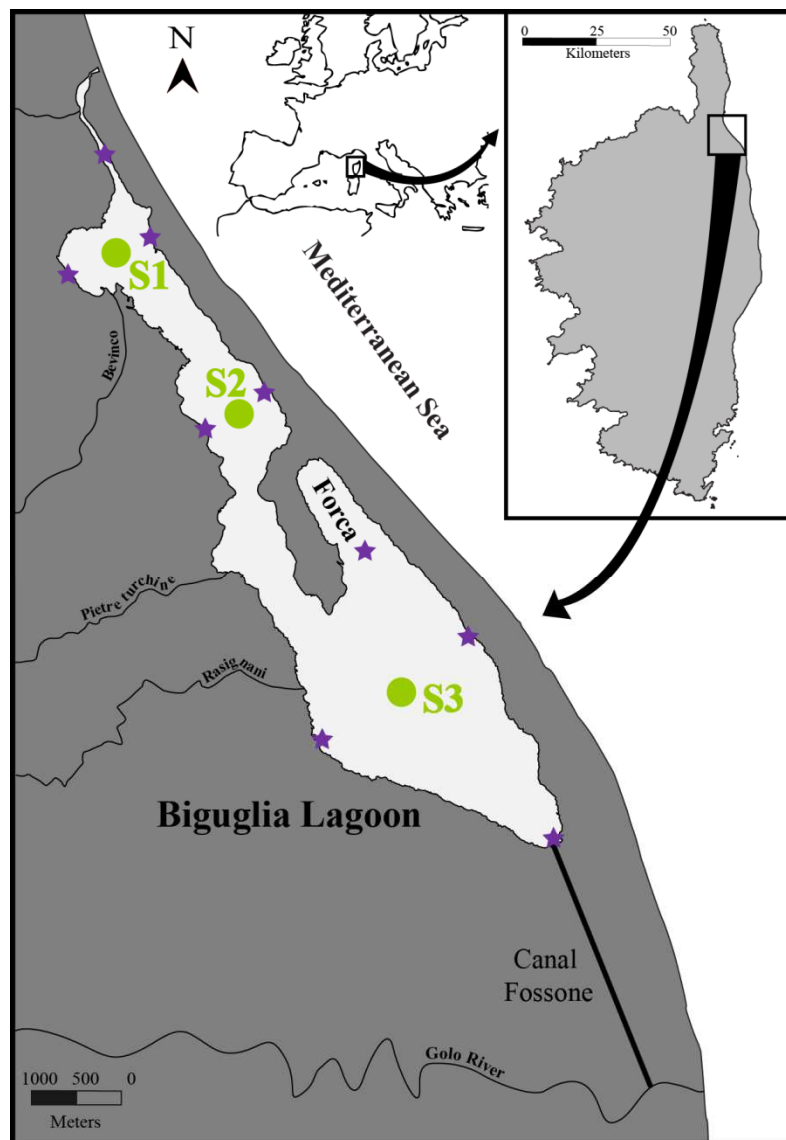


Figure VI.1. Localization of the study site with stations sampling. Stations S1, S2 and S3 are represented by black circles. The dark stars indicate the nine stations sampled during in May, July, August and October 2010.

This lagoon exhibits a strong spatial salinity gradient controlled by water fluxes and modulated by its shape (Figure VI.1). An important decrease of salinity is observed since

2000 that concerns mainly its Southern basin (Figure VI.2). The range of salinity is particularly low compared to others Mediterranean coastal lagoon (Souchu *et al.*, 2010). The lagoon receives fresh water from an artificial channel connected to the Golo river that is situated at its extreme South (Fossone canal; Figure VI.1), from small rivers that drain its watershed (180 km²) mostly in its Northern part, from pumping stations that drain the Marana agricultural plain in the South Western part, and from rain inputs (Frisoni & Dutrieux, 1992).

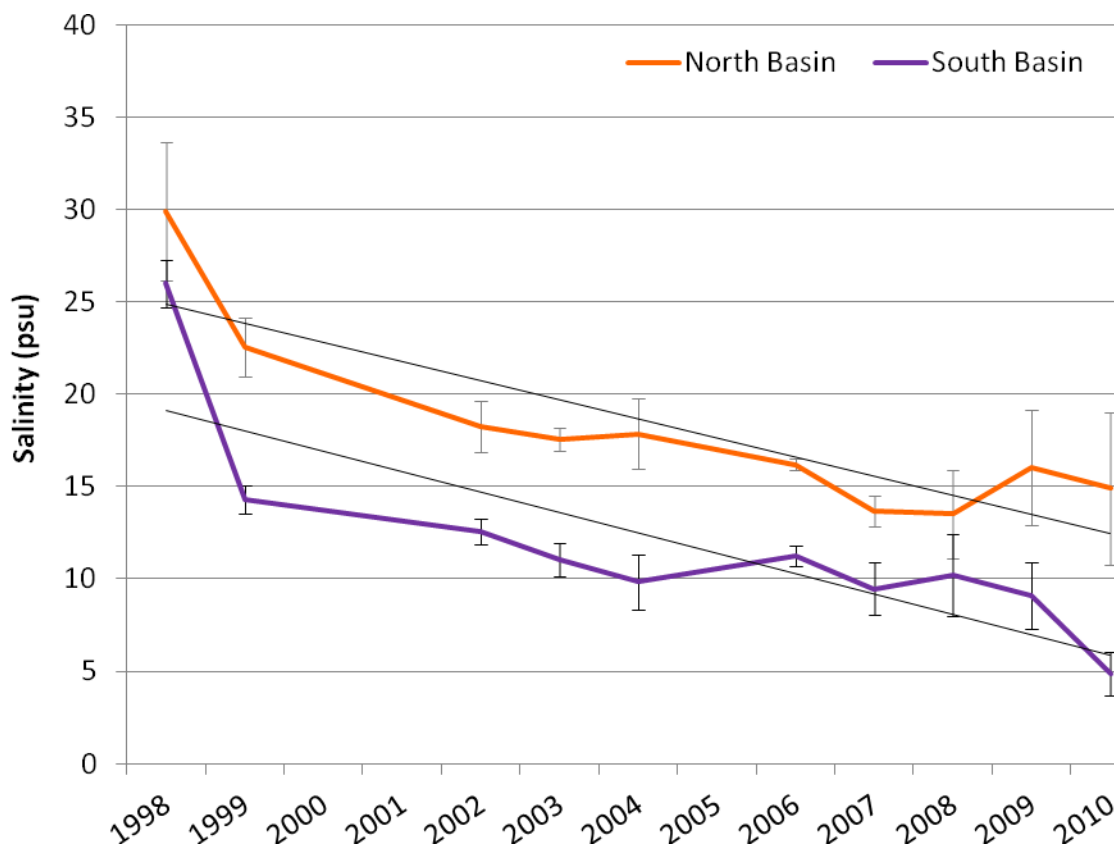


Figure VI.2. Mean summer values of salinity in Biguglia lagoon with linear regression and standard error (IFREMER data; this work).

Fresh water inputs dominate the water budget ($22 \times 10^6 \text{ m}^3$ per year compared to the total volume of the lagoon, 10.2 Mm^3) and lagoon renewal is rapid (< 2 months; Frisoni & Dutrieux, 1992). Biguglia lagoon is intermittently connected to the sea in the north by a long (1.7 km), shallow and narrow natural channel that crosses the lido. Exchanges with the sea remain limited, because this channel tends to close (sand accumulation), requiring sometimes human interventions to open it again. This context leads to impaired water quality: nutrients supplied by run-off (high ammonium concentration; Orsoni *et al.*, 2001)

accumulate with a reduced possibility at dilution by seawater. An important siltation has also been documented, with important accumulations of organic matter in the whole lagoon, which are responsible of the regression of *Zostera noltii* beds (Pergent-Martini *et al.*, 2005). These elements highlight (i) the deleterious impact of continental inputs (mainly concentrated in the Northern basin), (ii) the increasing eutrophication of the ecosystem, and (iii) the confinement of Southern basin. In 2007, a dystrophic crisis occurred in summer in the confined Southern basin with important Chl *a* concentrations up to 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ that have been associated to the massive development of the potentially toxic Cyanophyceae *Anabaenopsis circularis* (Data IFREMER).

To improve the quality of Biguglia lagoon, management efforts have been undertaken by Authorities. In 2009 the cleaning out of the Fossone canal has been realized to increase fresh water inputs from the Golo River, with the aim of decreasing the confinement of the Southern Basin and then alleviating further potential dystrophic crisis.

In this context, and despite evidences of increasing threats, studies devoted to phytoplankton communities remain scarce: no regular monitoring have been conducted, except in the framework of the (national) Lagoon Monitoring Network (RSL; IFREMER) each summer since 1998 since the previous comprehensive studies that have been conducted in 1992 and 2001 (Frisoni & Dutrieux, 1992; Orsoni *et al.*, 2001). This paper aims to update knowledge and to provide indications regarding water management and its impacts on phytoplankton communities in the Biguglia lagoon. Further, we'll discuss the relevance of water flux management as a strategy to alleviate eutrophication in such coastal lagoons. Specifically, we'll analyze the impacts of salinity variations on the structure and photosynthetic efficiency of phytoplankton communities on an annual basis. Monthly phytoplankton samples were collected in 2010 in three stations of the Biguglia lagoon, to identify the main taxonomic groups (Microscopy), to quantify their pigment composition (HPLC), and to measure their photosynthetic activity (Phyto-PAM). Data were analyzed in reference to the environmental conditions that have been simultaneously monitored.

VI.2. Materials and methods

VI.2.1. Study site and sampling strategy

The Biguglia lagoon, a shallow brackish coastal lagoon (maximum depth: 1.8 m) with a length of 11 km, a width of 2.5 km and a surface area of 14.5 km², is the widest wet zone of Corsica. Located along the Eastern coast (42°36' N, 09°28' E; Figure VI.1), the lagoon has been acknowledged as a RAMSAR site since 1994 (Pasqualini *et al.*, 2006). Biguglia lagoon is under the influence of a Mediterranean climate with a succession of dry (winter and summer) and wet seasons (spring and fall; Nicolas *et al.*, 1995) that strongly control the in situ environmental conditions. Significant variations in salinity (4 to 37 psu) and temperature (3 to 28 °C) have been documented at various temporal and spatial scales. The prevailing winds are the Libeccio (South-West) and the Sirocco (South-East). As the lagoon is very shallow (average depth of 1.2 m), winds exceeding 5 m.s⁻¹ (frequency of these winds ≈15 %) bring enough energy to induce the mobilization and resuspension of the superficial layer of the sediment (Mouillot *et al.*, 2000). Depending on direction and intensity, winds play also a crucial role in controlling water exchanges with the Sea (BCEOM 2006).

Water samples for the different analyses were collected monthly in 2010 directly from the boat (sub-surface samples), between 7h30 am and 8h30 am (local time), in three stations (S1, Bevinco Cove; S2, Northern basin and S3, Southern basin; Figure VI.1). During 4 months (May, July, August and October) vertical profiles were performed on these three principal stations (S1, S2 and S3) whereas subsurface samples were also collected in nine others stations (Figure VI.1). In-field sampling locations were localized using a GPS (Garmin 45XL) receiver.

VI.2.2. Physical and chemical variables

For each sampled station, sub-surface of salinity, temperature, dissolved oxygen and turbidity measurements were performed with a multiparameter Water Quality Probe (YSI Environmental Monitoring Systems, 6600 V2-2), which has been also used to perform vertical profiles in station S1-S2-S3 during summer months. For the three principal stations, a sub-sample of water was systematically fixed immediately after collection according to Aminot & Kérouel (2004) for further ammonium analyzes. Ammonium concentrations were assessed by spectrophotometry, according to blue indophenol method (Aminot & Kérouel,

2004). Other sub-samples were filtered over GF/F membranes and frozen at -20 °C within one hour after collection for further nitrate and silicate analyzes. The concentrations of these nutrients were measured with a Technicon AutoAnalyser II (precision ± 25 nM), according to working procedures of Tréguer & Le Corre (1975). Meteorological data for 2010 (rainfall, daily precipitation in mm) came from Météo-France data recorded at the weather stations at Bastia airport located near the lagoon.

VI.2.3. Phytoplankton analysis

In order to identify and quantify the composition of the phytoplankton communities sampled in the three principal stations, 50 L of water were monthly concentrated through a silk Apstein 20 μ m-screen plankton net, and 100 mL were recovered and fixed with 2.5 % formaldehyde solution. All samples were stored at room temperature in the dark until observations. We examined each sample according to the Utermöhl method (Utermöhl, 1958; AFNOR, 2006) in using an inverted microscope (Olympus® CKX41). Numeration at 200 x and 400 x magnifications was carried out on diametrical tapes or on the total chamber surface depending on species size and abundance (Lund *et al.*, 1958). When possible, 400 cells were counted to ensure that the error in estimation of cellular abundance remains within the limits of ± 10 % (Uehlinger, 1964).

For pigment analysis, ± 200 mL of the water samples in S1, S2 and S3 - prefiltered through a 200 μ m mesh to eliminate mesozooplankton and large debris - were filtered under low vacuum pressure (<200 mm Hg) through on 25 mm diameter Whatman GF/F glass fiber filters (nominal pore size 0.7 μ m). The filters were stored in a freezer (-80 °C) until analysis. Then, samples were extracted in methanol using sonication (Jeffrey *et al.*, 1997) and were analyzed by HPLC (Waters Alliance 2695) according to the technique of Zapata *et al.* (2000).

VI.2.4. Fluorescence measurements

Photosynthetic parameters of phytoplankton communities were monthly assessed for the three principal stations in using a Phyto-PAM ED fluorometer and its dedicated Phyto-Win software, (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). After collection, samples were continuously maintained in the dark at in situ water temperature, so we did not proceed

with a specific dark-adaptation period as classically indicated. A 2 mL sample was introduced into the measuring chamber and allowed to stabilize at modulated (non-actinic) light (ML, $1 \mu\text{mol photon cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) for a couple of minutes. The intrinsic fluorescence yield (F_0) of dark-adapted sample was then recorded. A short saturating pulse (SP) was applied (wavelength peak: 655 nm; intensity: $4\,000 \text{ mmol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; duration: 200 ms) to induce the maximal fluorescence yield (F_m) on dark-adapted cells. Determining F_0 and F_m makes it possible to evaluate the variable fluorescence, $F_v = F_m - F_0$, and allows the calculation of the maximum efficiency of photosystem II, F_v / F_m (Kitajima & Butler, 1975; Bolhàr-Nordenkamp *et al.*, 1989). The ratio F_v/F_m is related to the potential (maximum) photochemical efficiency of PSII and indicates the fraction of the absorbed energy channeled to photosynthesis by PSII reaction centers. The sample was then exposed to actinic light (AL) for 190 s, and five consecutive saturating pulses SP were applied at 30 s intervals, the first after 60 s of exposure. AL intensity was adjusted to $\approx 1\,000 \mu\text{mol photons cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (mean annual value of sub-surface in situ irradiance at midday). The application of periodic SP every 30 s makes it possible to measure changes in maximal fluorescence yield (F'_m). At the steady state of electron transport under AL, effective quantum yield, Φ_{PSII} , was obtained by the ratio $(F'_m - F)/F'_m$ (Genty *et al.*, 1989). Such variable fluorescence can be used as measure of PSII activity when assessed with a defined light history (corresponding to in situ conditions), because it depends on open and potentially active PSII units (Körner & Nicklisch, 2002). The operational quantum yield thus defined corresponds also to the effective quantum yield of samples. See methodological details in Garrido *et al.* (2013). Measurements were realized in triplicates for each sample.

VI.2.5. Statistics

All data were analyzed with two statistical softwares: XLStat® V2011 5.01 and SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc.). Two-way ANOVA combined with Tukey's HSD post-hoc tests were used to compare the photosynthetic parameters (F_v/F_m and Φ_{PSII}) depending on seasons, stations and their potential interactions (Scherrer, 1984). Given the non-normality of data, the non parametric Kruskal-Wallis test was used to explore the variations between abiotic parameters and seasons. Non-parametric correlation (Spearman's rank correlation)

or regression analysis between parameters were calculated to determine the relationship between photosynthetic parameters and salinity.

VI.3. Results

VI.3.1. Environmental conditions

The salinity was ranged from 37.5 psu over the channel in July in sub-surface to 0.2 psu at Western cove of Bevinco river in May in depth. The variations salinities between sub-surface and depth during four months were more important in S1 (amplitude max: 12.5 psu in July), while water column was homogeneous in S3. For the three principal stations, two main periods were reported, with firstly, low and fluctuating salinities below 8 psu from January to June and then a period from August to December with salinities above 10 psu. The inter-season was characterized by a strong and sudden increase of salinity in all stations, but shifted in time between June and August depending on the station (Figure VI.3A). The lowest values were observed in S1 between January and May with 1.6 and 0.5 psu respectively (Figure VI.3A). The highest salinities were also noted in S1 from July up to 14.5 psu in September. This station was characterized by the highest intra-annual variations (amplitude max: 13.9 psu , coefficient of variation (CV): 64 %; Figure VI.3A). The two other stations appeared comparatively relatively buffered, the station S2 being the less variable (amplitude max: 8.0 psu, CV: 42%; Figure VI.3A). Beyond these important differences, at the annual scale, huge tendencies were shared by the three stations (Spearman Rank Coefficients, $p < 0.05$). Sub-surface temperature followed a logical and seasonal pattern varying between 7.7 °C (January) and 29.6 °C (July, all stations combined (S1, S2, S3; Figure VI.3B). Sub-surface turbidity ranged from 0.7 to 14.0 NTU in the lagoon (Figure VI.3C). The turbidity values in S3 were significantly different (with an annual mean of 6.4 NTU; $p < 0.05$, Kruskal-Wallis) than S1 and S2 values (1.7 and 2.4 NTU respectively; Figure VI.3C). The lagoon was well oxygenated during 2010, with percentage of oxygen saturation raised from 73.4 % to 134.4 %. The lowest values were observed during the summer for the three stations (July and September, $p < 0.05$, Kruskal-Wallis; Figure VI.3D).

Chapitre VI: Water fluxes management improved phytoplankton communities?

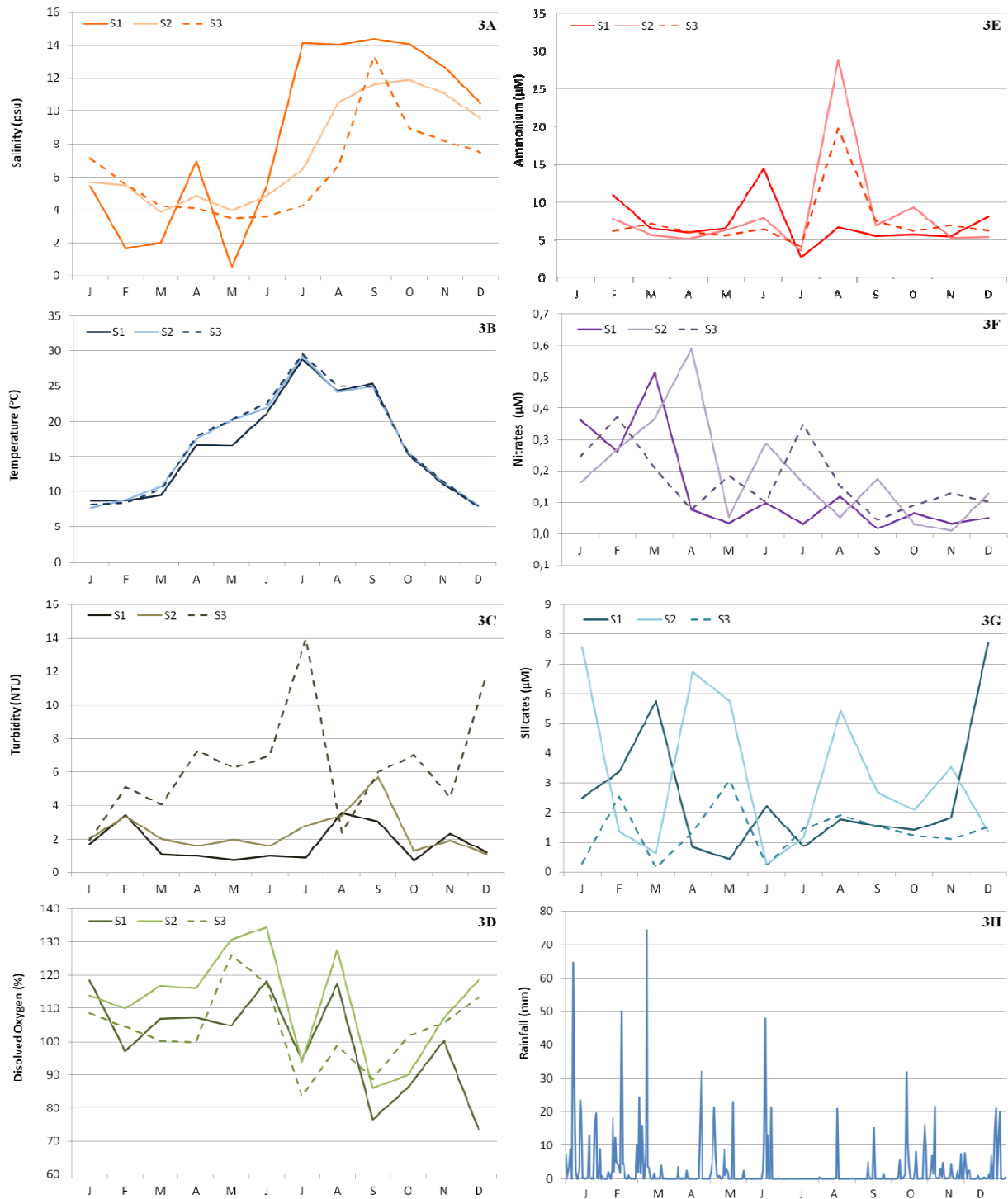


Figure VI.3. Spatio-temporal variations of the environmental parameters during 2010 on the three principal stations (S1, S2 and S3): 3A: salinity; 3B: water temperature; 3C: turbidity; 3D: dissolved oxygen; 3E: ammonium; 3F: nitrates; 3G: silicates; 3H: daily rainfall (Météo-France data)

Ammonium concentrations presented strong variations during the annual cycle on the three stations in Biguglia lagoon (Figure VI.3E). Concentrations varied from 2.6 μM (in S1 in July) up to 28.9 μM (in S2 in August; Figure VI.3E). Maximum values were recorded in August in S2 and S3 (28.9 and 19.8 μM respectively) and in June in S1 (6.6 μM ; Figure VI.3E).

Nitrate concentrations were generally lower than the ammonium concentrations and exhibited significant fluctuations throughout the year. Between April and May, a strong decrease in nitrate concentrations was observed in S1, with values near or below detection limits until December (mean of 0.1 μM from April to December; Figure VI.3F). In S2, high of nitrates were measured from January to May followed by a decrease until December with only a peak in June (0.3 μM ; Figure VI.3F). For S3 station nitrate values remained < 0.4 μM . Two peaks were recorded in February and July with 0.4 μM (Figure VI.3F). Silicate concentrations ranged from 7.7 μM (in December at S1) and 7.6 μM (in January at S2) to 0.2 μM (in March at S3; Figure VI.3G). S1 and S2 presented strong variations during the annual cycle compared to S3 (Figure VI.3G). Many rainfall events were recorded on Biguglia lagoon during 2010 in winter and in fall (mean monthly, 124.6 mm; Figure VI.3H) and two rainfall periods for later spring season in May and June, with a monthly average of 92.8 mm (Figure VI.3H). Events winds superior at 5 m.s^{-1} are important (frequency: 95 % in 2010). The prevailing winds are the Libeccio (South-West) and the Sirocco (South-East). The winds were not strong concerning intensity with a monthly average strength of 2.4 m.s^{-1} (standard error 0.2).

VI.3.2. Variations of phytoplankton structure

Chlorophyll *a* concentrations exhibited very large spatio-temporal variations throughout the 2010 annual cycle and varied between 0.3 to 42.0 $\mu\text{g/l}$ (Figure VI.4). The highest biomass were recorded in January, August and November for S1 (22.6 $\mu\text{g/l}$, 21.9 $\mu\text{g/l}$ and 10.2 $\mu\text{g/l}$ respectively), in February and August for S2 (25.5 $\mu\text{g/l}$ and 16.2 $\mu\text{g/l}$ respectively) and in July, October and December for S3 (42.0 $\mu\text{g/l}$, 17.8 $\mu\text{g/l}$ and 16.0 $\mu\text{g/l}$ respectively; Figure VI.4).

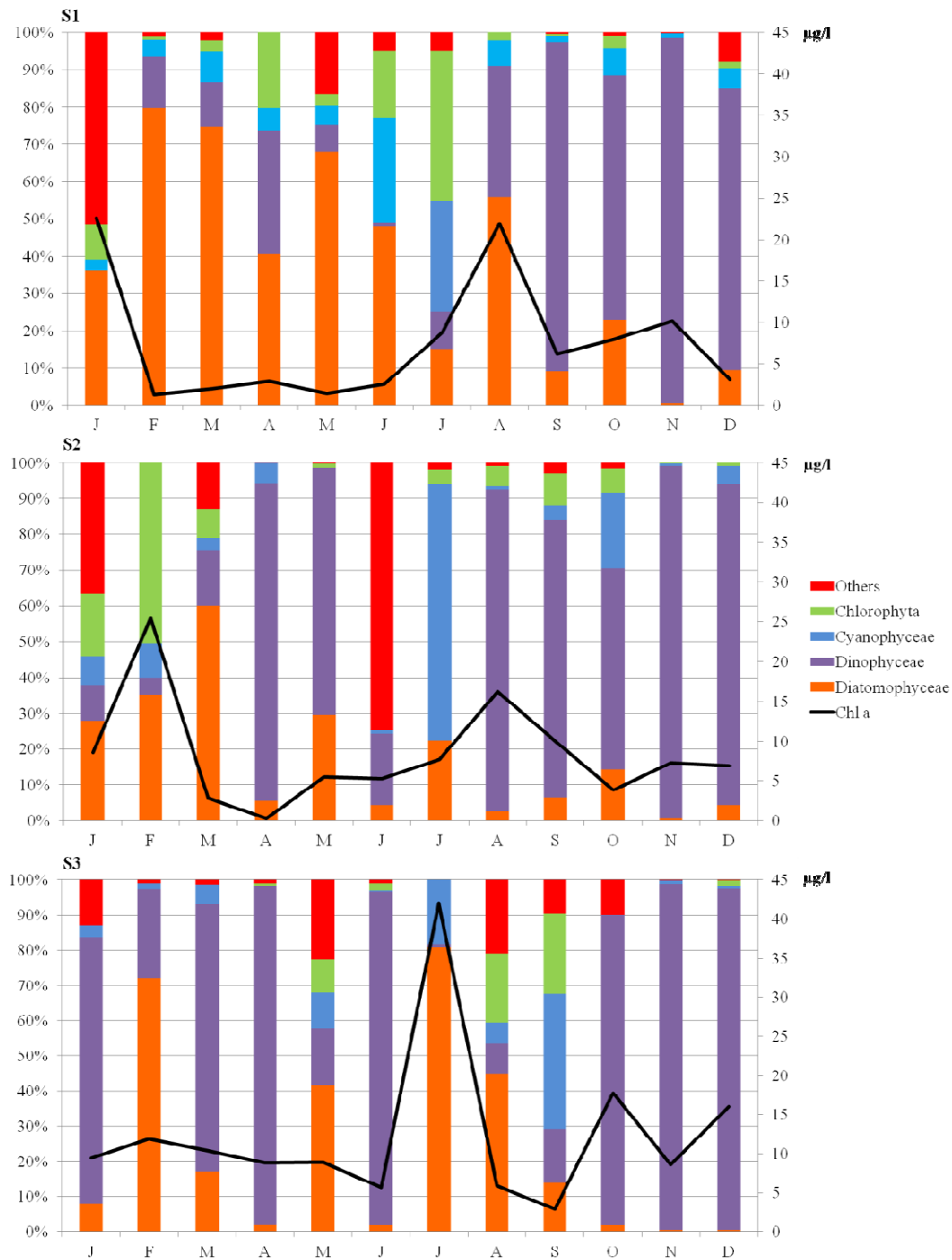


Figure VI.4. Spatio-temporal evolution of the relative proportion of different taxonomic groups of phytoplankton at S1, S2 and S3 (histogram, left scale), with the variation of Chl *a* concentration for each station (line, right scale).

The spatio-temporal variability of Chl *a* concentrations was associated to characteristic composition. In S1, alloxanthin was recorded in winter, fucoxanthin was the dominant pigment during spring and summer, and peridinin was the dominant pigment during fall (Table VI.1). In S2, fucoxanthin and alloxanthin were dominant pigments during winter/spring and peridinin was dominant pigment in summer/fall. The months of June and

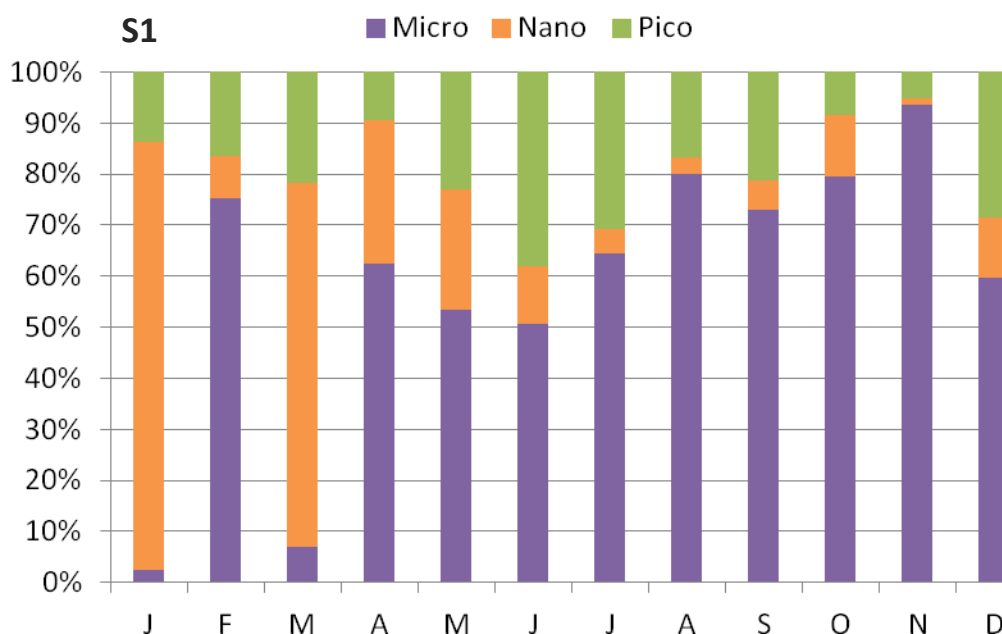
July were mainly represented by Chl *b* (Table VI.1). In S3, the winter was marked by alloxanthin, spring/summer by different pigments (with Chl *b*), and fall by peridinin (Table VI.1).

Table VI.1. Seasonal specific characterization of phytoplankton communities in Biguglia lagoon on each stations (Ø no dominant taxonomic groups).

Months	Dominant pigment	Dominant taxonomic groups
S1		
January	Alloxanthin	Ø
February	Fucoxanthin	Diatomophyceae (<i>Diatoma</i> sp)
March	Alloxanthin	Diatomophyceae (<i>Diatoma</i> sp)
April	Fucoxanthin	Ø
May	Fucoxanthin	Diatomophyceae (<i>Melosira</i> sp, <i>Navicula</i> sp)
June	Fucoxanthin	Diatomophyceae / Cyanophyceae (Oscillatoriales, <i>Anabaenopsis</i> sp)
July	Fucoxanthin	Chlorophyta
August	Fucoxanthin	Diatomophyceae (<i>Chaetoceros</i> sp) / Dinophyceae (<i>Prorocentrum</i> sp)
September	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
October	Peridinin	Dinophyceae (<i>Alexandrium</i> sp, <i>Prorocentrum minimum</i>)
November	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum</i> sp)
December	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
S2		
January	Alloxanthin	Cryptophyta
February	Fucoxanthin	Chlorophyta / Diatomophyceae
March	Alloxanthin	Diatomophyceae
April	Fucoxanthin	Dinophyceae
May	Alloxanthin	Dinophyceae / Diatomophyceae (<i>Melosira</i> sp)
June	Chl <i>b</i>	Cryptophyta / Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
July	Chl <i>b</i>	Cyanophyceae (<i>Anabaena</i> sp, <i>Lyngbia</i> sp)
August	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
September	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
October	Alloxanthin	Dinophyceae (<i>Protoperidinium</i> sp)
November	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
December	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
S3		
January	Alloxanthin	Ø
February	Alloxanthin	Ø
March	Alloxanthin	Ø
April	Fucoxanthin	Dinophyceae (<i>Alexandrium</i> sp)
May	Peridinin	Dinophyceae (<i>Alexandrium</i> sp) / Cyanophyceae (<i>Spirulina</i> sp)
June	Chl <i>b</i>	Dinophyceae (<i>P. minimum</i>) / Cyanophyceae (Oscillatoriales) / Diatomophyceae
July	Fucoxanthin	Diatomophyceae
August	Chl <i>b</i>	Ø
September	Alloxanthin	Cyanophyceae (<i>Anabaena</i> sp)
October	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
November	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)
December	Peridinin	Dinophyceae (<i>Prorocentrum minimum</i>)

Almost all of the genera counted were Diatomophyceae and Dinophyceae (Table VI.1; Figure VI.4). *Prorocentrum minimum* was the species primarily found (up to $5\,933 \times 10^3$

cell.L⁻¹ in S3 in November). In S1, Diatomophyceae and Dinophyceae were the two classes will be observed, with a dominance of Diatomophyceae in the first semester (winter/spring) and the dominance of Dinophyceae rest of the year (summer/fall). In S2, Diatomophyceae and Dinophyceae were the main taxonomic groups encountered with a dominance of *Prorocentrum minimum* and we also observed a wide variety of genera of Diatomophyceae, the most abundant being: *Cocconeis* sp, *Diatoma* sp, *Melosira* sp, *Nitzschia* sp (Table IV.1, Figure IV.4). During summer the presence of Cyanophyceae has been registered with *Anabaena* sp and *Lyngbia* sp with 100 x 10³ cell.L⁻¹ (Table VI.1; Figure VI.4). Concerning S3, the microphytoplankton accounted for 40.9 % of the total biomass throughout the year, notably with important values in fall with especially Dinophyceae and mainly *Prorocentrum minimum* (Table VI.1; Figure VI.4). Cyanophyceae were observed during June, July and September with 195 x 10³ cell.L⁻¹ (Table VI.1; Figure VI.4). In S1, microphytoplankton in subsurface waters was dominated, except in January and March, where nanophytoplankton were important (Figure VI.5). The contribution of picophytoplankton was low with the maximum in summer (Figure VI.5). In S2, two main periods were reported, with micro- and nanophytoplankton from January to May and then from August to December (Figure VI.5). The inter-season was characterized by picophytoplankton. In S3, the dynamic of nano- and picophytoplankton was similar compared to S2 ($p < 0.05$; Spearman rank order; Figure VI.5). Microphytoplankton variations were significantly different on the three stations ($p > 0.05$; Spearman rank order; Figure VI.5).



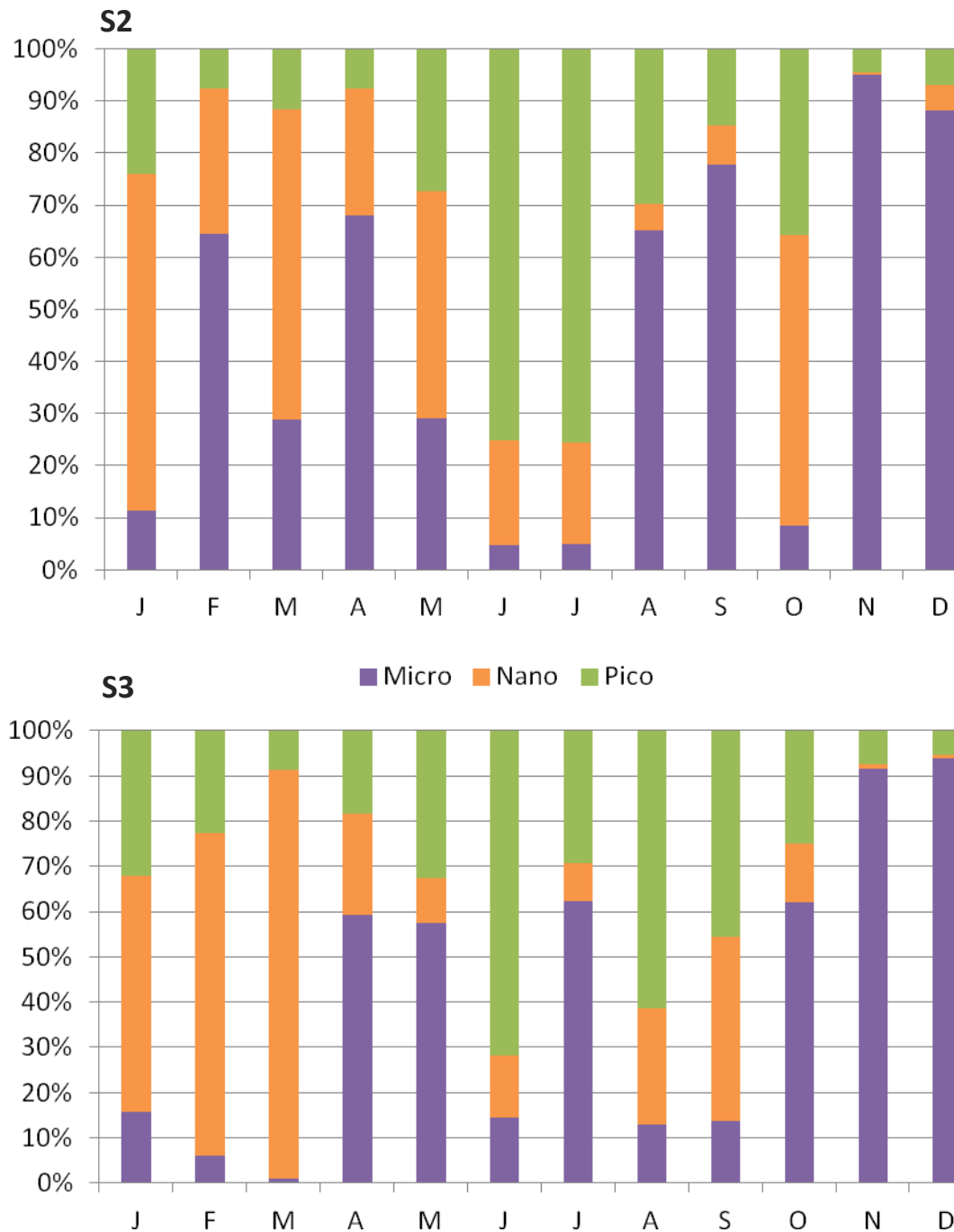


Figure VI.5. Spatio-temporal evolution of the relative proportion of different size classes of phytoplankton at S1, S2 and S3. Biomass size classes (micro-, nano- and picophytoplankton) were according to the equation of Vidussi *et al.* (2001).

VI.3.3. Photosynthetic efficiency of phytoplankton

The mean maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) values showed variations during annual cycle (Figure VI.6A), with minimal values 0.42 (at S1 and S2 in winter) and maximal value 0.58 (at S2 in summer). The two-way ANOVA showed no significantly difference between the stations for each season ($p > 0.5$; Figure VI.6A). However, there is a

statistically significant difference between the seasons ($p < 0.005$). The two-way ANOVA allows us to identify two distinct periods ($p < 0.05$), with a winter period significantly different from the summer and fall (Tukey test; $p < 0.05$; Figure VI.6A).

Operational quantum yield (Φ_{PSII}) values showed not same global trends as for F_v/F_m values (Figure VI.6B). Maximum and minimum values were observed at S3 station. Maximal value has recorded in winter with 0.37 and for minimal value in fall with 0.22. The two-way ANOVA showed no significantly difference between the stations for each season ($p > 0.5$; Figure VI.6B). However, there is a statistically significant difference between the seasons ($p < 0.05$). The two-way ANOVA allows us to identify two distinct periods ($p < 0.05$), with a winter period significantly different from the fall (Tukey test; $p < 0.05$; Figure VI.6B).

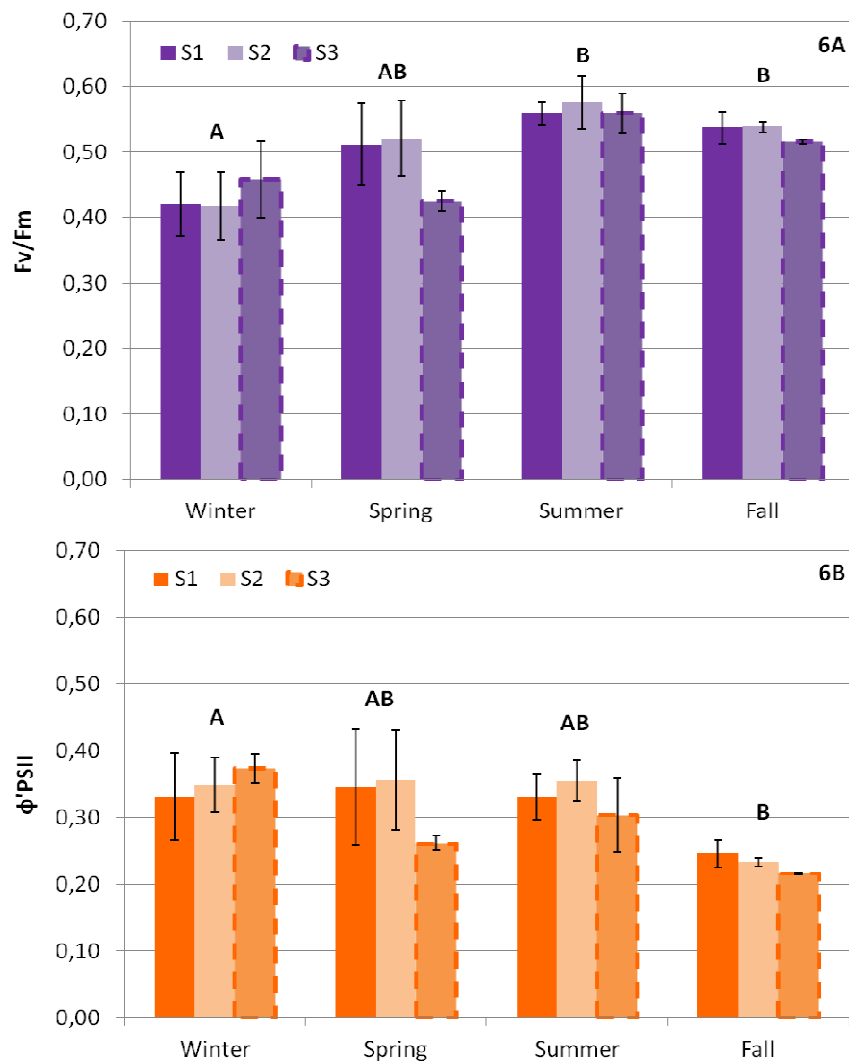


Figure VI.6. Spatio-temporal variations of the maximum efficiency of photosystem II (PSII), Φ_{PSII} or F_v/F_m (6A) and of the operational quantum yield measured under actinic light, Φ'_{PSII} (6B) for the three stations (groups values that did not differ at the 0.05 level - Tuckey post hoc tests - were assigned the same letter).

As the stations are similar for each season, the mean relative value of both photosynthetic parameters measured (F_v/F_m and Φ_{PSII}) was calculated on the annual cycle (Figure VI.7). Two periods were alternated on the lagoon with the first semester (from January to June) where both fluorescence ratios have covariate (Figure VI.7) and a second semester (from July to December) characterized by decoupling of the F_v/F_m and Φ_{PSII} (Figure VI.7).

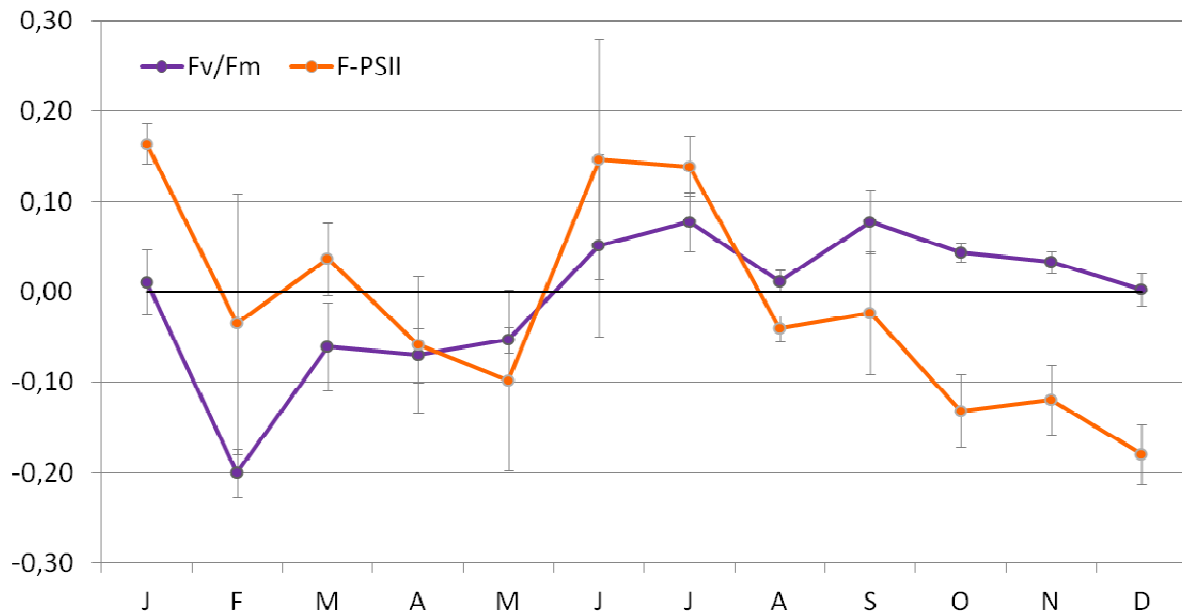


Figure VI.7. Relative monthly means (on three stations) of efficiencies parameters (F_v/F_m and Φ_{PSII}) measured by Phyto PAM.

During this second period, F_v/F_m values were stable and high (mean of six months 0.55; Figure VI.7), although the Φ_{PSII} decreased (from 0.40 in July to 0.2 in December; Figure VI.7).

VI.4. Discussion

The processes of eutrophication and its impact on the phytoplankton communities and ecological functioning of the lagoons are well documented (Cloern, 2001; Anderson *et al.*, 2002; Smith, 2006; Chomérat *et al.*, 2007; Collos *et al.*, 2009; Bec *et al.*, 2011a,b). The Biguglia lagoon offers the opportunities to have a confined ecosystem experimenting with strong spatial salinity gradient controlled by water fluxes and modulated by its shape and a growing eutrophication since 1980. To improve the confinement and eutrophication conditions of this lagoon, management efforts have been implemented on hydrological fluxes and it is crucial to follow and assessment the impact on the structure and photosynthetic efficiency of the phytoplankton communities.

The functioning of a lagoon is governed largely by the nature and intensity of water relations it has with adjacent ecosystems. The degree of exchange with the sea or confinement of the lagoon, highlighted by the characteristics haline lagoon environments, are accountable for the biological structuring within these ecosystems (Guelorget *et al.*, 1983; Frisoni, 1987; Gravina *et al.*, 1989; Guelorget & Perthuisot, 1992; Chatzigeorgiou *et al.*, 2011). In our study, two periods are successive. During the first period, the freshening affected the lagoon with values < 8 psu. The minimum values were recorded in S1, directly under the influence of flow of the Bevinco river, fed spring precipitation. It is also during this period that was observed at S1 station large phytoplankton, particularly pinnate Diatomophyceae. Indeed, Diatomophyceae are generally adapted to more turbulent environments characterized by high nutrient concentrations (Margalef, 1978; Smayda, 1980). Furthermore, the appearance of these species may be correlated to strong wind events common in winter, which resuspend benthic Diatomophyceae in the water column and strip attached Diatomophyceae from surfaces (de Jonge & van Beusekom, 1995). For stations S2 and S3, small Diatomophyceae and phytoflagellates were dominant. The relative importance of these group increases in shallow lagoons exposed to high nutrient loads from continuous inputs of fresh water or discontinuous floods (Bec *et al.*, 2011a). These conditions were encountered in the southern part of the lagoon Biguglia, in connection with the cleaning out of the Fossone canal.

The inter-season was marked by low precipitation and strong and sudden increase in salinity of the three stations, with a time lag (S1 in June, S2 in July and S3 in August). The maximum values of salinity were consistently observed in S1, open to the sea through the channel at its northern end. The Diatomophyceae are scarce, replaced by Dinophyceae, Chlorophyta and Cyanophyceae. Picophytoplankton and Cyanophyceae abundances were often low in Biguglia lagoon, except during the summer with an increase during June and July. Indeed, for both picophytoplankton and Cyanophyceae, the highest values for maximum growth rates were measured during the warmest and brightest months (July to September), and the annual variations in growth rates displayed a strong seasonality which could be related to water temperature and/or irradiance (Iriarte & Purdie, 1994; Agawin *et al.*, 1998; Bec *et al.*, 2005; Chomérat *et al.*, 2007; Bec *et al.*, 2011a). A strict correlation

between Cyanophyceae and salinity was also observed in Spain, where an increase in this species was directly proportional to the increase in salinity (Pérez & Carrillo, 2005). In the most degraded ecosystems, populations become dominated by autotrophic Cyanophyceae species (Barica & Mur, 1980; Paerl, 1996; Scheffer *et al.*, 1997; Chomérat *et al.*, 2007), leading to a subsequent reduction in biodiversity (Abrantes *et al.*, 2006) and decrease the density of marine species and to increase consumption of brackish species (Reizopoulou & Nikolaidou, 2004). The presence of Cyanophyceae in lagoons decreased enormously only after the strong rainfall in the autumn and winter, when the large input of fresh water into the lagoon caused a decrease in salinity (Chomérat *et al.*, 2007; Pulina *et al.*, 2011).

During the second period of the year, salinity was always > 8 psu across the lagoon with a slight decrease from October. The maximum values of salinity were again observed at station S1. *Prorocentrum minimum* was the dominant species with a bloom across the lagoon, with a cell density higher in S3. *Prorocentrum minimum* has been described as a eurythermal and euryhaline species and blooms can occur under a wide range of environmental conditions (Tango *et al.*, 2005). In many cases, blooms occur in relatively warm, low turbulence environments during periods of high irradiance. In Chesapeake Bay, high density blooms are found when temperatures are between 12–22 °C and salinity is 5-10 psu (Tango *et al.*, 2005). However, temperature may not be a limiting factor for the development of *Prorocentrum minimum* blooms (Grzebyk & Berland, 1996). These environmental conditions were encountered in Biguglia lagoon in this period, particularly in connection with the S3 confinement, despite the cleaning out of the Fossone canal in 2009. Moreover, *Prorocentrum minimum* must be considered potentially toxic, not beneficial to the food web (Heil *et al.*, 2005). It should be noted, however, that several studies do document the existence of subtle negative effects when *Prorocentrum minimum* is used as a food source, most notably a reduction in zooplankton egg production when compared with diatom diets (Turner *et al.*, 2001).

PAM fluorescence is a rapid and reliable method for assessing the photosynthetic performance of marine and fresh water phytoplankton (Schreiber *et al.*, 1994; Baker, 2008). Fv/Fm is classically used as a sensitive indicator of the general level of state of photosynthetic organisms (Kolber & Falkowski, 1993; Schreiber *et al.*, 1994; Lippemeier *et*

al., 1999; Maxwell & Johnson, 2000; Parkhill *et al.*, 2001). While maximal Fv/Fm values can change depending on the dominant phytoplankton classes (Büchel & Wilhelm, 1993), non-limited algal communities exhibit Fv/Fm values around 0.6 to 0.7 (Kromkamp & Peene, 1999; Yentsch *et al.*, 2004). Fv/Fm values higher than 0.5 are classically associated to a satisfactory physiological acclimation of phytoplankton to environmental conditions (Parkhill *et al.*, 2001; Yentsch *et al.*, 2004; Claquin *et al.*, 2010), whereas lowest values have been related to nutrient deficiency in natural conditions (e.g. Kolber & Falkowski, 1993). Changes in Fv/Fm (and/or other fluorescence-induced proxies) can thus provide relevant information on the effects of different types of stressors on photosynthetic organisms, and are increasingly being used for this purpose. The theoretical photosynthetic performance (Fv/Fm) and effective (Φ PSII), on the first period of the year, covariated with variations in salinity. In our study, changes in salinity appears to promote photosynthetic efficiency directly and/or indirect, because photosynthetic parameters values can change depending on the dominant phytoplankton classes (Büchel & Wilhelm, 1993). The second period, there was no link between changes in salinity and changes in photosynthetic performance, characterized by Fv/Fm which remains high throughout the lagoon (> 0.5), while Φ PSII fell dramatically on each stations (i.e. for all ranges of salinity encountered at that time in the lagoon). For Φ PSII, winter and fall are statistically different groups. However, in winter hydrology appears to be the dominant factor (directly or indirectly related to continental inputs via the Bevinco river and marine inputs via the channel) while in autumn, the significant decrease observed of Φ PSII homogeneous on the lagoon did not appear related to the same hydrological determinism. The hypothesis of an inhibiting factor is advanced and could be related with the high abundance of *Prorocentrum minimum*. This species is a widespread, bloomforming Dinophyceae found in many coastal waters and estuaries around the world (Anderson *et al.*, 2002; Heil *et al.*, 2005). Blooms of this species have increased in frequency and appear to have undergone a geographical expansion over the past several decades, possibly related to human activity and eutrophication within localized systems (Grzebyk & Berland, 1996; Heil *et al.*, 2005). Using epifluorescent techniques, the presence of food vacuoles has been confirmed in *Prorocentrum minimum* populations especially during summer nutrient limiting periods during which 45 % of the cells were observed to ingest particles (Li *et al.*, 1996). Further study suggested that this feeding process is primarily a mechanism for obtaining limiting nitrogen rather than a mechanism for supplementing carbon nutrition during light

limitation (Stoecker *et al.*, 1997). This feeding mechanism could contribute to the ability of *Prorocentrum minimum* to dominate and form blooms under nutrient-limiting conditions. In addition, Collos *et al.* (2005) show that ammonium stimulates the activity of β -carboxylases that may be associated with the heterotrophy (Peak & Peak, 1981; Descolas-Gros & Oriol, 1992). In Biguglia lagoon, we recorded throughout the year, concentrations of ammonium always $> 5 \mu\text{M}$. This information combined with the abundance of dominant *Prorocentrum minimum* with the drastic reduction ΦPSII during the second period, we can speculate that if the potential yield decline, but not the maximum efficiency of PSII, the energy produced by *Prorocentrum minimum* will be used for heterotrophy and not for photosynthesis.

Besides impacts of water flux management on the structure and photosynthetic efficiency of phytoplankton communities, we must noted that the freshening have also impacted the biological structuring of the ecosystem through the important development of aquatic magnoliophyte (*Najas major*), notably in the South basin during 2010 (35 % of cover area), never observed before in this lagoon (Pasqualini *et al.*, 2006; Etourneau, com. pers.). Furthermore, than managers observed an expansion of the common Carp (*Cyprinus carpio*) over large part of the Biguglia since several years.

In conclusion, improving of the water quality is a major challenge for the future of Biguglia lagoon. The channel is the main vector of exchanges with the sea that fresh waters of the lagoon minimum required, at least in the northern part. However, marine inputs remain primarily in the north of S1 station. At S2 and S3 stations, the waters are renewed more slowly by diffusion, especially in windy conditions, and due to fresh water inflows (e.g. Fossone canal). Following the cleaning out of the Fossone canal, in 2009, fresh water inputs were increased when weather conditions (rain and wind) were favorable and thus constituted a barrier to penetration of seawater into the lagoon. Despite its positive impact on turnover and on environmental quality in summer (bloom of Cyanophyceae limited), cleaning out of the Fossone canal was therefore a confinement factor. These conditions favored the development of *Prorocentrum minimum* in the second period of the year and have had an impact on its physiology. All these results suggest a relative restoration of environmental quality, however, the eutrophication of Biguglia lagoon remains worrying. Indeed, enrichment by the catchment and pumping stations with an increase in the presence

of opportunistic species, are characteristic signs of the sensitivity of the lagoon eutrophication. The case study on Biguglia lagoon provides valuable information to demonstrate that a partial water fluxes management can significantly alter structure and photosynthetic efficiency of phytoplankton communities, but also across the lagoon ecosystem.

The absence of a real management on the control structure exchanges between sea and lagoon as well as contributions from the different canals likely induce disturbance in these ecosystems, which by their confinement are very dependent on fresh water and marine inputs. The restoration of the lagoons can not be done only on condition of ensuring the quality of fresh water that feed the ecosystem and the well functioning of sewerage systems. Internationally, the restoration of coastal marine ecosystems, including the lagoon ecosystems, has already been approached, however the views of the problems and effects of these managements on biological communities, research still to be developed. The first observations and theoretical considerations cast doubt on the fact that coastal marine systems have undergone major disruptions over several decades can return to their original state history and highlight a cruel breach of data describing the trajectories of return to the original state when the restore process (Elliott *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2009).

CHAPITRE VII

Impact of contaminated sediment resuspension on phytoplankton in a Mediterranean lagoon: Functional and structural responses



Ce chapitre fait l'objet d'un article sélectionné (Lafabrie C.*, Garrido M.*, Leboulanger C., Cecchi P., Gregori G., Pasqualini V., Pringault O.) pour un numéro spécial d'une revue internationale indexée au *Journal Citation Reports (Estuarine, Coastal and Shelf Science)*.

* *Egal contribution to the work*

VII.1. Introduction

Coastal lagoons are critical transition zones that provide essential ecosystem services - including shoreline protection, water quality improvement, fisheries resources, and habitat and food for a wide range of species (Levin *et al.*, 2001) - whose estimated economic value is significant (i.e., 22,832 \$US.ha⁻¹.year⁻¹ ; Costanza *et al.*, 1997). However, because more than 40 % of the world's population live within 100 km of the coast and an even larger population is predicted within the next two decades (Martinez *et al.*, 2007; Duxbury & Dickinson, 2007), coastal lagoons are increasingly subject to anthropogenic pressures. Chemical contamination of the environment, mainly originating from industrial, agricultural and domestic wastes, poses growing threats to these systems (Levin *et al.*, 2001). Sediment is traditionally viewed as a sink for contaminants. However, when it is disturbed, moved or relocated, sediment-bound contaminants may be remobilized into the water column (Latimer *et al.*, 1999; Saulnier & Mucci, 2000) and become bioavailable to pelagic species.

Sediment can thus act as a substantive source of contaminants (Burton & Johnston, 2010; Roberts, 2012), and contaminated sediment resuspensions may then be viewed as pulsed disturbances resulting in pulsed exposures of biota to chemicals (Roberts, 2012). Sediment resuspension events may occur during storms and wind-driven waves, and are particularly significant in shallow water systems such as coastal lagoons. Resulting effects on biota of overall flux of contaminants from sediments to the water column have remained understudied until now and not thoroughly incorporated into ecological risk assessment (Roberts, 2012).

While accounting for only 1 to 2 % of the total photosynthetic carbon biomass, phytoplankton contributes to approximately 45 % of primary production on Earth (Field *et al.*, 1998), and therefore plays a major role in biogeochemical cycles and in the functioning of marine ecosystems. As a result of its position at the basis of numerous food webs, any alteration in its structure and physiological activity may trigger a cascade of impacts throughout the entire ecosystem. In coastal lagoons, sediment resuspensions are likely to induce significant and recurring exposures of native phytoplankton to contaminants. Understanding how planktonic photoautotrophs respond to xenobiotics is thus of primary

importance in order to forecast the ecological consequences of the chemical contamination of the environment and to target priority management and restoration efforts.

Several studies have reported detrimental effects of contaminants on phytoplankton (e.g., see reviews of DeLorenzo *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2008). However, as highlighted by some authors (e.g., Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2008; Laviale *et al.*, 2010), most previous research lack environmental realism. The main reason is that past experiments were mainly based on laboratory investigations typically performed under controlled conditions, from single-contaminant tests and without taking into account biotic and abiotic environmental factors. Yet, it has been often demonstrated that phytoplankton responses to contaminants may be influenced, among others, by species interactions (Leboulanger *et al.*, 2001; Ortmann *et al.*, 2012), grazing pressure (Munoz *et al.*, 2001), temperature (Bérard *et al.*, 1999), water chemistry (Knauer *et al.*, 2007), light exposure history (Guasch & Sabater, 1998; Laviale *et al.*, 2010) or contamination exposure history (Dorigo *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2009). Furthermore, in its natural environment, phytoplankton is exposed to chemical mixtures and, depending on the mixture, additive, synergistic or antagonistic effects may result from contaminant interactions (DeLorenzo & Fleming, 2008; Knauert *et al.*, 2009; Relyea, 2009). Consideration of environmental context thus appears to be of primary importance to achieve comprehensive understanding of biological effects of multiple contamination (see reviews Clements & Rohr, 2009; Clements *et al.*, 2012).

In the present study, we examined the short-term impacts of resuspended contaminated sediment on a lagoon phytoplankton community. The experimental system consisted in *in-situ* immersed microcosms, as they have been shown to be realistic models to assess effects of xenobiotics on natural communities (de la Broise & Palenik, 2007). Besides, to mimic exposure of organisms to contaminants likely to be released during contaminated sediment resuspensions, phytoplankton was exposed to contaminated sediment elutriates. The acute effects of elutriates on phytoplankton were assessed through the characterization of structural and functional responses of the natural community over a short time period.

VII.2. Material and methods

VII.2.1. Study area

With a surface area of 14.5 km², the Biguglia lagoon (42° 37' N, 9° 27' E; Figure VII.1) is the largest wetland of Corsica. It is linked to the Mediterranean Sea through a narrow channel in the north and trough the Fossone canal in the south (Figure VII.1).

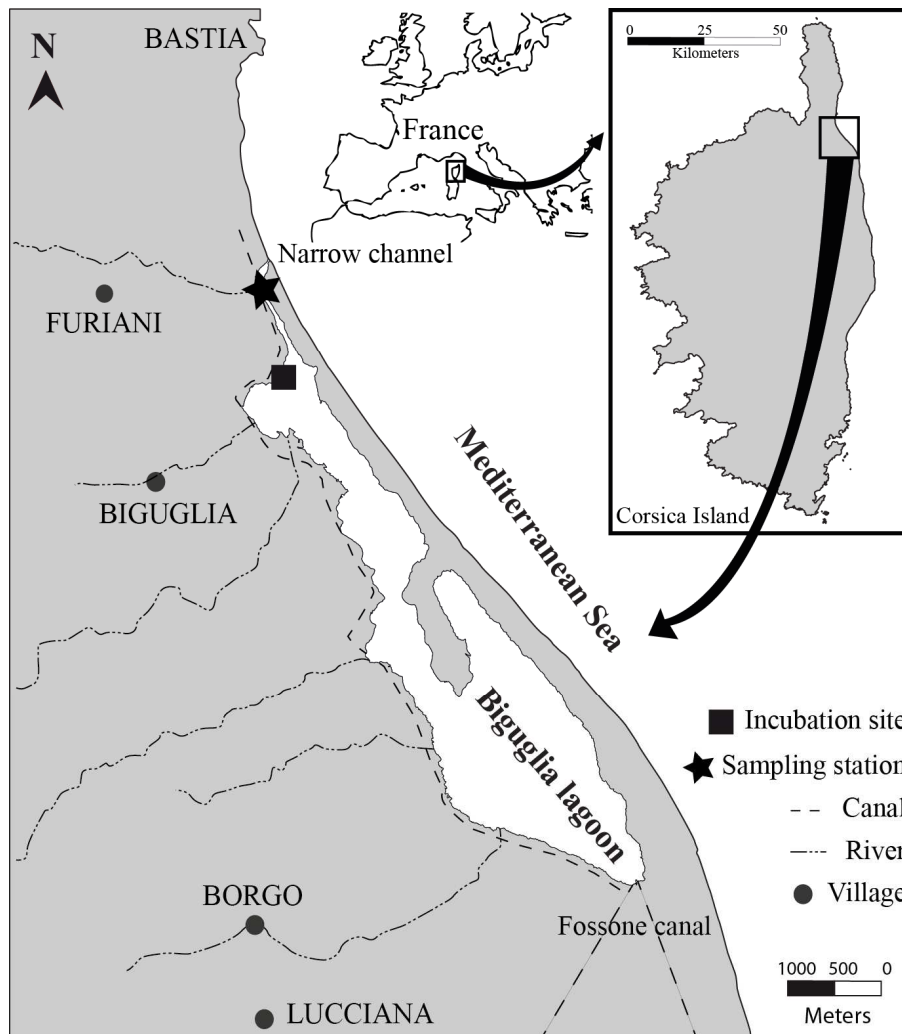


Figure VII.1. Localization of the sampling station in the Biguglia lagoon (Corsica, France).

The prevailing winds are the Libeccio (south-west) and the Sirocco (south-east). As the lagoon is very shallow (average depth of 1.2 m), winds exceeding 5 m.s⁻¹ (frequency of these winds: ≈15%) bring enough energy to mobilize and resuspend the superficial layer of the sediment (Mouillot *et al.*, 2000). This lagoon presents a high biological interest; in 1990, it has been included in the RAMSAR list (list of wetlands of international interest). Its watershed lies on the south-west of the city of Bastia and covers an area of 180 km². Four

villages occupy the watershed and represent approximately 35 000 inhabitants in winter, and around twice more in summer. For the past four decades, urbanization and human activities (particularly tourism, agricultural and industrial activities) have been quickly increasing all around the lagoon (GEOMORPHIC, 2003) and represent at present substantial threats for the water quality and the ecological equilibrium of the lagoon.

VII.2.2. Sediement elutriate preparation and contaminant analysis

Sediment and water samples were collected in the Biguglia channel (see the sampling station on Figure VII.1) because of its proximity to urban, industrial and agricultural zones that are likely to induce multiple contaminations. Sediment was collected using a Van Veen grab and sieved (2 mm mesh) to eliminate fauna and plant/wood fragments. Water was collected with a bucket and immediately filtered (200 µm mesh; removal of the largest fragments and organisms). Three sediment subsamples were stored in glass bottles until contaminant analyses. Another sediment subsample was added to filtered water (1:4 w/v ratio) and stirred for 8 h to mimic resuspension, according to the method of Geffard *et al.* (2002). After an 8 h settling period, the overlying solution was siphoned off and 0.2 µm filtered (successive filtrations: 200 µm mesh net, 20 µm mesh net, 3 µm pore size Whatman glass fiber filters, and 0.2 µm pore size Nucleopore membrane filters) in order to eliminate microorganisms. This solution constituted the contaminated sediment elutriate (CSE). One part of the CSE was diluted with 0.2 µm filtered water in order to prepare a half-diluted CSE (CSE½).

Contaminant analyses of sediment and elutriates were performed at the Laboratory of Rouen (COFRAC accredited laboratory, France; <http://www.laborouen.com>). They included the following chemical groups: trace metals (8), organotins (3), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH; 16), pesticides (58), phenols and derivatives (23), polybromodiphenyl ethers (10), halogenated solvents (4), aromatic solvents (16), and chloroalkanes (sum of C10-C13). In total, 139 individual substances, listed as priority pollutants in several Directives (e.g., European Water Framework Directive 2000/60/EC), were analyzed.

VII.2.3. Microcosm experiment

The *in situ* microcosm experiment was performed from July 11 to 15, 2011. Twelve 3.5 L glass bottles (Schott-Duran) were used for microcosms (Control, CSE½ and CSE; four replicates each). 1.4 L of 200 µm filtered water, collected in the Biguglia lagoon (sampling station; Figure VII.1) shortly before, were poured in all microcosms. The 200 µm filtration allowed to eliminate large debris and the major part of zooplankton, minimizing thus grazing effects during incubation. 1.4 L of CSE and CSE½ were added in the CSE and CSE½ microcosms, respectively; and 1.4 L of 0.2 µm filtered field water were added in the Control microcosms to get the same sample dilution than in treated microcosms. All microcosms were overlaid by 0.7 L of air (20 % of the total volume), allowing the system to be representative of the natural environment (de la Broise & Palenik, 2007). The Control and CSE½ microcosms were enriched with NH_4^+ so that this limiting nutrient was present in similar concentrations in all microcosms at the beginning of the experiment.

Microcosms were incubated at 40 cm depth in the lagoon (incubation site; Figure VII.1) to mimic the *in situ* environmental conditions of temperature and irradiance. Water temperature and photosynthetically available radiation within the microcosms were continuously measured during the experiment (temperature data logger HOBO ProV2, Onset; light intensity recorder MkV/L, Alec Eletronics). Samples were collected from each microcosm, at the beginning of the incubation (700 mL), and after 8 h (100 mL), 24 h (100 mL), 48 h (300 mL), 72 h (100 mL) and 96 h (the remaining 1.5 L) of incubation, for subsequent analyses. Nutrient analyses were performed at the Laboratory of Rouen. Biological and physiological analyses are detailed in the following sections. Salinity (85 DO/Conductivity Instrument, YSI) and pH (pH-meter SB70P, SYMPHONY) were measured in microcosms at each sampling time.

VII.2.4. Analysis of photosynthetic activity efficiency

Biomass (i.e., concentration of all antenna pigments that transfer absorbed energy via Chlorophyll *a* (Chl *a*) to the photosynthetic reaction centers) and photosynthetic activity efficiency of samples were evaluated with a pulse-amplitude-modulated fluorometer (PHYTO-PAM Phytoplankton Analyzer; Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). Samples

were kept in the dark during processing. 2 mL were introduced into the measuring chamber and allowed to stabilize at modulated (non-actinic) light (ML) for a couple of minutes. The maximum photosystem II (PSII) quantum yield (F_v/F_m) was determined using the following equation: $F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$ (Kitajima & Butler, 1975). The very low level of energy supplied by ML induces the initial intrinsic fluorescence, F_o , that represents the fluorescence when all PSII reaction centers are open and potentially available for electron transport (i.e. photosynthesis). F_m , the maximal fluorescence was measured after application of a saturating pulse of light (wavelength peak: 655 nm; intensity: 4 000 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; duration: 200 ms). The effective (or operational) quantum yield of PSII (ϕPSII) was determined as follow: $\phi\text{PSII} = (F'm - F_s) / F'm$ (Genty *et al.*, 1989). F_s , the light-adapted constant fluorescence level, was measured under actinic light ($\approx 1\,000\, \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), and $F'm$, the light-adapted maximal fluorescence level, was recorded during five consecutive saturating pulses given at 30 s intervals (first pulse applied after 60 s of light exposure) and averaged.

VII.2.5. Phytoplankton group discrimination by fluorometry

A multiwavelength fluorometer (FluoroProbe, bbe-Moldaenke, Kiel FRG) was used to identify and quantify the biomass (in eq. Chl *a*) linked to the main phytoplankton groups that 185 occurred in samples (i.e., Chlorophyceae, Cyanophyceae, Diatomophyceae/ Dinophyceae, and Cryptophyceae; see methods in Beutler *et al.*, 2002; Leboulanger *et al.*, 2011). Measurements were made from 25 mL of dark-adapted sample that were continuously stirred within a 25 mL glass cuvette. Data were recorded during 60 s and then averaged over this period.

VII.2.6. HPLC pigment analysis

Samples (up to 200 mL) were filtered through 25 mm Whatman GF/F glass fiber filters (0.7 μm pore size), and then filters were frozen at $-80\,^{\circ}\text{C}$ until analysis. Pigment extraction was realized in methanol by sonication (Jeffrey *et al.*, 1997). After a 30 min freezing at $-20\,^{\circ}\text{C}$, extracts were filtered on GF/F filters to remove debris. Pigment identification and quantification were made by high-performance liquid chromatography (HPLC, C8 reverse phase column; Waters Alliance 2695), according to Zapata *et al.* (2000).

The concentrations of key chlorophyll and carotenoid pigments (chemotaxonomic markers) can be used to discriminate different phytoplankton taxa and thus to determine phytoplankton community composition (Jeffrey *et al.*, 1997; Vidussi *et al.*, 2001). Chl *a* was selected as a proxy of the total biomass. Ratios of diagnostic pigment (alloxanthin, 19'-hexanoyloxyfucoxanthin, fucoxanthin, peridinin, and zeaxanthin) to total Chl *a* were used to estimate the relative abundances of the principal taxonomic phytoplankton groups (i.e., Cryptophyceae, Prymnesiophyceae, Diatomophyceae, Dinophyceae, and Cyanophyceae, respectively).

VII.2.7. Microscopy analyses

At the beginning of the experiment, 50 L of water were collected in the sampling station. They were filtered and concentrated using an Apstein net (20 µm mesh size; final volume: 100 mL). The sample was then fixed with formaldehyde (2.5 %, final concentration), and stored in the dark until microscopic observations. At the end of the incubation, samples from each replicate microcosms were pooled and 1 L was fixed with acid Lugol's iodine solution (5 %, final concentration), and then stored in the dark until microscopic observations. Subsamples of 20 mL were poured in settling chambers for sedimentation (Utermöhl, 1958; AFNOR, 2006). Identification, to the lowest possible taxonomic level, and quantification of phytoplankton cells were realized using a phase-contrast inverted microscope (CKX41, OLYMPUS). To ensure that the error in estimation of cellular abundance remains within the limits of ± 10 %, a minimum of 400 cells were counted when possible (Uehlinger, 1964; Lund *et al.*, 1958).

VII.2.8. Flow cytometry analyses

Samples (1.4 mL) were fixed with 0.2 µm filtered formaldehyde (37%) and stored at -80 °C until analyses. Flow cytometry analyses were performed at the Regional Flow Cytometry Platform for Microbiology (PRECYM; <http://precym.com.univ-mrs.fr>) of the Mediterranean Institute of Oceanography, using a FACScalibur flow cytometer (488 nm Argon laser and 635 nm diode laser; Becton Dickinson). For each particle (cell) analyzed, two light scatter intensities were collected: the forward angle light scatter, related to the size of the particles; and, the right angle light scatter (or side scatter), related to their shape and granularity. Additionally, four fluorescence intensities were collected: FL1 - Green

fluorescence (centered on 530 nm); FL2 - Orange fluorescence (centered on 585nm); FL3 - Red fluorescence (>650 nm); and, FL4 - Far Red fluorescence (induced by the 635 nm diode laser, centered on 661 nm). In this study, FL2, FL3, and FL4 signals were related to phycoerythrin, chlorophyll, and phycocyanin contents of the cells, respectively. To focus on phytoplankton, the trigger signal was set up on the red signal (FL3) induced by the 488 nm laser beam. The flow rate of the sheath fluid was set on “High”, and the flow rate of the samples was adjusted to “Low” ($\approx 12 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$) or “High” ($\approx 100 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$), depending on the particle richness of samples. Filtered synthetic seawater (successive filtrations through 0.8 and 0.2 μm porosity Acropak filters) constituted the sheath fluid. 2 μm beads (Fluoresbrite YG, Polyscience) and TruCount beads (Becton Dickinson) were used as internal standards and to control the flow rates, respectively. Data were acquired with the Cell Quest software (Beckton Dickinson), and analyzed using the WinList software (Verity Software House, USA).

VII.2.9. Statistical analysis

Differences in parameters among treatments (fixed factor, 3 levels: control, CSE $\frac{1}{2}$, and CSE) and time (fixed factor, 6 levels: 0, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h) were investigated with a twoway factorial analysis of variance (ANOVA; STATISTICATM245). Where ANOVA revealed significant differences, Tukey’s HSD post hoc comparison test were performed to determine where significant differences occurred. All tests were assessed at the $P= 0.05$ level.

VII.3. Results

VII.3.1. Contaminant concentrations in sediment and elutriates

Table VII.1 shows the contaminant concentrations measured in sediment and elutriates. Three chemical groups were detected in sediment: trace metals, organotins, and PAHs. In elutriates, the main substances found were trace metals and PAHs.

Table VII.1. Concentrations of chemical substances in sediment (mean \pm SE) and elutriates (CSE: contaminated sediment elutriate; CSE½: half-diluted contaminated sediment elutriate) at the beginning of the experiment. Concerning sediment, concentrations are expressed in $\mu\text{g.g}^{-1}$ dry wt. for trace metals; in Sn.kg^{-1} dry wt. for organotins; and in $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dry wt. for polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides, phenols and derivatives, polybromodiphenyl ethers, halogenated solvents, aromatic solvents, and chloroalkanes). Concerning elutriates, concentrations are expressed in $\mu\text{g.L}^{-1}$ for all elements, except for polycyclic aromatic hydrocarbons and organotins that are expressed in ng.L^{-1} and Sn.L^{-1} , respectively.

		Sediment	CSE	CSE½
Trace metals (8)	Arsenic (As)	5.5 \pm 0.2	8.0	5.0
	Cadmium (Cd)	0.2 \pm 0.0	bdl	0.1
	Chromium (Cr)	164.7 \pm 2.6	25.4	16.8
	Copper (Cu)	42.0 \pm 1.0	15.2	10.4
	Mercury (Hg)	0.1 \pm 0.0	0.076	0.094
	Nickel (Ni)	116.0 \pm 1.0	25.9	17.8
	Lead (Pb)	23.3 \pm 0.3	6.7	3.4
	Zinc (Zn)	108.7 \pm 0.9	30	25
Organotins (3)	Monobutyltin (MBT)	4.8 \pm 0.3	0.003	0.003
	Dibutyltin (DBT)	3.1 \pm 0.4	0.005	0.007
	Tributyltin (TBT)	3.2 \pm 0.2	bdl	bdl
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH; 16)	Naphtalene (Nap)	12.7 \pm 6.9	bdl	bdl
	Acenaphtene (Ace)	44.5 \pm 35.9	bdl	bdl
	Fluorene (Flr)	20.9 \pm 17.1	bdl	bdl
	Phenanthrene (Phe)	67.8 \pm 31.7	bdl	bdl
	Anthracene (Ant)	10.9 \pm 4.1	bdl	bdl
	Fluoranthene (Flt)	118.6 \pm 43.3	11	12
	Pyrene (Pyr)	118.5 \pm 54.0	bdl	bdl
	Benzo(a)anthracene (BaA)	65.9 \pm 31.8	9	9
	Chrysene (Chry)	61.9 \pm 31.5	12	15
	Benzo(b)fluoranthene (BbF) *	71.3 \pm 38.1	16	15
	Benzo(k)fluoranthene (BkF) *	38.0 \pm 20.0	7	7
	Benzo(a)pyrene (BaP)	75.7 \pm 39.2	18	17
	Dibenzo(a,h)anthracene (DahA)	7.1 \pm 3.6	bdl	bdl
	Benzo(g,h,i)perylene (BgHiP) *	91.5 \pm 49.4	25	18
	Indeno(cd)pyrene (Ind) *	63.7 \pm 33.9	15	14
	Acenaphtylene (Acy)	bdl	bdl	bdl
Pesticides (58)	Linuron	bdl	bdl	bdl
	Metoxuron	bdl	bdl	bdl
	Methabenzthiazuron	bdl	bdl	bdl
	Chlortoluron	bdl	bdl	bdl
	Monolinuron	bdl	bdl	bdl
	Metobromuron	bdl	bdl	bdl
	Neburon	bdl	bdl	bdl
	Monuron	bdl	bdl	bdl
	Isoproturon	bdl	bdl	bdl
	Diuron	bdl	bdl	bdl
	Pentachlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	Alpha-HCH	bdl	bdl	bdl

Chapitre VII: Resuspended contaminated sediment in Biguglia lagoon

	Beta-HCH	bdl	bdl	bdl
	Hexachlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	Gamma-HCH (lindane)	0.7 ± 0.2	bdl	bdl
	Heptachlore	bdl	bdl	bdl
	Aldrin	bdl	bdl	bdl
	Isodrin	bdl	bdl	bdl
	Exo-Epoxy-Heptachlor	bdl	bdl	bdl
	Endo-Epoxy-Heptachlor	bdl	bdl	bdl
	o,p'-DDE	bdl	bdl	bdl
	Alpha-Endosulfan	bdl	bdl	bdl
	p,p'-DDE	bdl	bdl	bdl
	Dieldrin	bdl	bdl	bdl
	o,p'-DDD	bdl	bdl	bdl
	Endrin	bdl	bdl	bdl
	Beta-Endosulfan	bdl	bdl	bdl
	p,p'-DDD	bdl	bdl	bdl
	o,p'-DDT	bdl	bdl	bdl
	Endosulfan sulfate	bdl	bdl	bdl
	p,p'-DDT	bdl	0.004	0.004
	Acetochlor	bdl	bdl	bdl
	Alachlor	bdl	bdl	bdl
	Chlordane	bdl	bdl	bdl
	Delta-HCHa	1.6 ± 0.2	bdl	bdl
	1,3-Hexachlorobutadiene	bdl	bdl	bdl
	Desethylatrazine	bdl	bdl	bdl
	Simazine	bdl	bdl	bdl
	Atrazine	bdl	bdl	bdl
	Terbutylazin	bdl	bdl	bdl
	Desethylsimazine	bdl	bdl	bdl
	Desethyl-Terbutylazine	bdl	bdl	bdl
	Dimethoate	bdl	bdl	bdl
	Diazinon	bdl	bdl	bdl
	Disulfoton	bdl	bdl	bdl
	Methyl-Parathion	bdl	bdl	bdl
	Methyl-Pyrimiphos	bdl	bdl	bdl
	Malathion	bdl	bdl	bdl
	Ethyl-Parathion	bdl	bdl	bdl
	Ethyl-Pyrimiphos	bdl	bdl	bdl
	Ethion	bdl	bdl	bdl
	Fenitrothion	bdl	bdl	bdl
	Ethylchlorpyrifos	bdl	bdl	bdl
	Methyl-Azinphos	bdl	bdl	bdl
	Ethyl-Azinphos	bdl	bdl	bdl
	Chlorfenvinphos	bdl	bdl	bdl
	Trifluralin	bdl	bdl	bdl
	Tributylphosphate	bdl	bdl	bdl
Phenols and derivatives (23)	2-chlorophenol	bdl	bdl	bdl

Chapitre VII: Resuspended contaminated sediment in Biguglia lagoon

	3-chlorophenol	bdl	bdl	bdl
	4-chlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,4-dichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,5-dichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,3-dichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,6-dichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	3,5-dichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	3,4-dichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,3,5-trichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,4,5-trichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,4,6-trichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,3,4-trichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	2,3,6-trichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	3,4,5-trichlorophenol	bdl	bdl	bdl
	4-chloro-3-méthylphenol	bdl	bdl	bdl
	Pentachlorophenol	bdl	bdl	bdl
	Nonylphenol	300.3 ± 250.3	4.16	7.43
	4-tert-butylphenol	bdl	bdl	bdl
	4-tert-octylphenol	bdl	bdl	bdl
	4-n-octylphenol	bdl	bdl	bdl
	4-para-nonylphenol	300.3 ± 250.3	4.16	7.43
	4-n-nonylphenol	bdl		
Polybromodiphenyl Ethers (10)	Pentabromodiphenyl Ether	bdl	bdl	bdl
	Octabromodiphenyl Ether	bdl	bdl	bdl
	Décabromodiphenyl Ether	bdl	bdl	bdl
	BDE 47	bdl	bdl	bdl
	BDE 77	bdl	bdl	bdl
	BDE 99	bdl	bdl	bdl
	BDE 100	bdl	bdl	bdl
	BDE 153	bdl	bdl	bdl
	BDE 181	bdl	bdl	bdl
	BDE 209	bdl	bdl	bdl
Halogenated solvents (4)	1,2-dichlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	Chloroform	bdl	bdl	bdl
	1,2-dichloroethane	bdl	bdl	bdl
	Dichloromethane	bdl	bdl	bdl
Aromatic solvents (16)	Benzene	8.7 ± 3.7	bdl	bdl
	Toluene	11.7 ± 6.7	bdl	bdl
	o-xylene	bdl	bdl	bdl
	m-xylene	bdl	bdl	bdl
	p-xylene	bdl	bdl	bdl
	Ethylbenzene	bdl	bdl	bdl
	1,3-dichlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	1,4-dichlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	1,2,4-trichlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	Chlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	4-chlorotoluene	bdl	bdl	bdl

Chapitre VII: Resuspended contaminated sediment in Biguglia lagoon

	3-chlorotoluene	bdl	bdl	bdl
	2-chlorotoluene	bdl	bdl	bdl
	1,3,5-trichlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	1,2,3-trichlorobenzene	bdl	bdl	bdl
	Isopropylbenzene (cumene)	bdl	bdl	bdl
Chloroalkanes (1)	C10-13 chloroalkanes	bdl	bdl	bdl

Concentrations in sediment equal to or above the ERL (effects range-low) value, and below the ERM (effects range-medium) value (Long *et al.*, 1995) are in bold.

Concentrations in sediment equal to or above the ERM value (Long *et al.*, 1995) are in bold and underlined.

* Compounds for which no effect ranges values were provided by Long *et al.* (1995).

bdl: below detection limits.

VII.3.2. Physico-chemical parameters

During the experiment, the water temperature in the incubation site varied from 29 to 33 °C, and the light irradiance into microcosms varied from 0 to 535 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (day/night cycle). Salinity and pH were similar in all microcosms, and throughout the experiment (≈ 24 psu and 8, respectively). Regarding nutrient, at the beginning of the experiment, the NO_2^- , H_3PO_4^- and SiO_4^{3-} concentrations were significantly higher in elutriate-treated microcosms than in control ones (Table VII.2). At the end of the experiment, the NO_3^- , NH_4^+ and SiO_4^{3-} concentrations were significantly lower in elutriate-treated microcosms than in control ones (Table VII.2).

Table VII.2. Nutrient concentrations (mean \pm SE; in $\mu\text{mol.L}^{-1}$) in the microcosms (Control, CSE, and CSE ½), at the beginning (t0) and the end of the experiment (t5, 96h of incubation).

	NO_3^-		NO_2^-		H_3PO_4^-		NH_4^+		SiO_4^{3-}	
	t0	t5	t0	t5	t0	t5	t0	t5	t0	t5
Control	0.61 ± 0.07^a	0.57 ± 0.03^a	0.11 ± 0.01^c	0.15 ± 0.01^{bc}	bdl ^c	bdl ^c	59.2 ± 16.0^a	45.9 ± 9.2^a	34.0 ± 0.4^c	19.9 ± 1.3^d
CSE ½	0.37 ± 0.09^{ab}	bdl ^b	0.18 ± 0.01^b	0.11 ± 0.01^c	1.18 ± 0.04^b	bdl ^c	43.1 ± 0.4^a	8.0 ± 1.1^b	52.3 ± 0.5^b	12.0 ± 0.8^e
CSE	0.35 ± 0.14^{ab}	bdl ^b	0.24 ± 0.02^a	0.11 ± 0.01^c	2.12 ± 0.07^a	bdl ^c	48.3 ± 0.5^a	4.3 ± 1.5^b	62.8 ± 0.1^a	12.5 ± 0.7^e

For statistical analyses, where measurements were below detection limits (bdl), values of one-half the detection limit were used.

Means sharing the same letter do not significantly differ ($P \geq 0.05$).

VII.3.3. Fluorescence parameters

Fluorescence parameters measured with the PHYTO-PAM phytoplankton analyzer are shown in Figure VII.2.

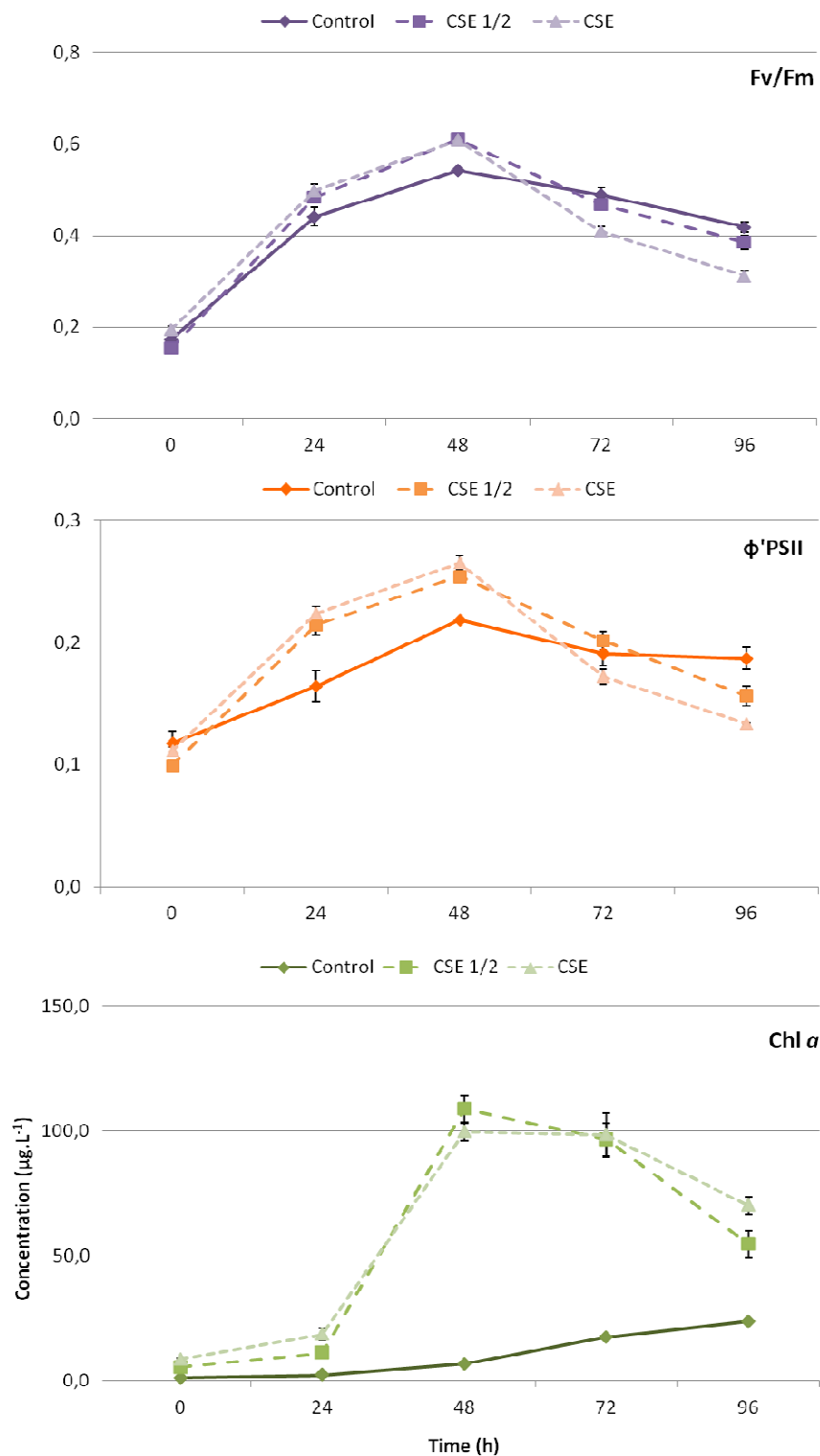


Figure VII.2. Temporal evolution of the fluorescence parameters (Fv/Fm, $\Phi'PSII$) and the total Chl α (mean \pm S.E.), measured with the PHYTO-PAM analyzer, in the different microcosms (Control, CSE $\frac{1}{2}$ and CSE).

Regarding Fv/Fm, no significant differences were observed between microcosms whereas significant differences were found for temporal variations (Table VII.3). Fv/Fm ranged from 0.15 ± 0.01 (CSE, at the beginning of incubation) to 0.61 ± 0.01 (CSE and CSE½, after 48 h of incubation). In contrast, significant differences between treatments were found for ϕ PSII; CSE½ and CSE phytoplankton communities exhibited higher effective quantum yield than the Control ones (Table VII.3). Temporal differences were also found significant (Table VII.3). ϕ PSII ranged from 0.10 ± 0.01 (CSE, at the beginning of incubation) to 0.27 ± 0.01 (CSE½, after 48 h of incubation). Photosynthetic pigment concentration significantly differed according to the treatment and the time (Table VII.3). It ranged from 1.27 ± 0.05 (Control, at the beginning of incubation) to $108.91 \pm 5.40 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CSE½, after 48h of incubation).

Table VII.3. ANOVA results for treatment (Control, CSE½, and CSE) and temporal (t0: 0; t1: 8h; t2: 24h; t3: 48h; t4: 72h; and, t5: 96h) differences in fluorescence parameters (A: Fv/Fm; B: ϕ PSII) and total Chl *a* (C).

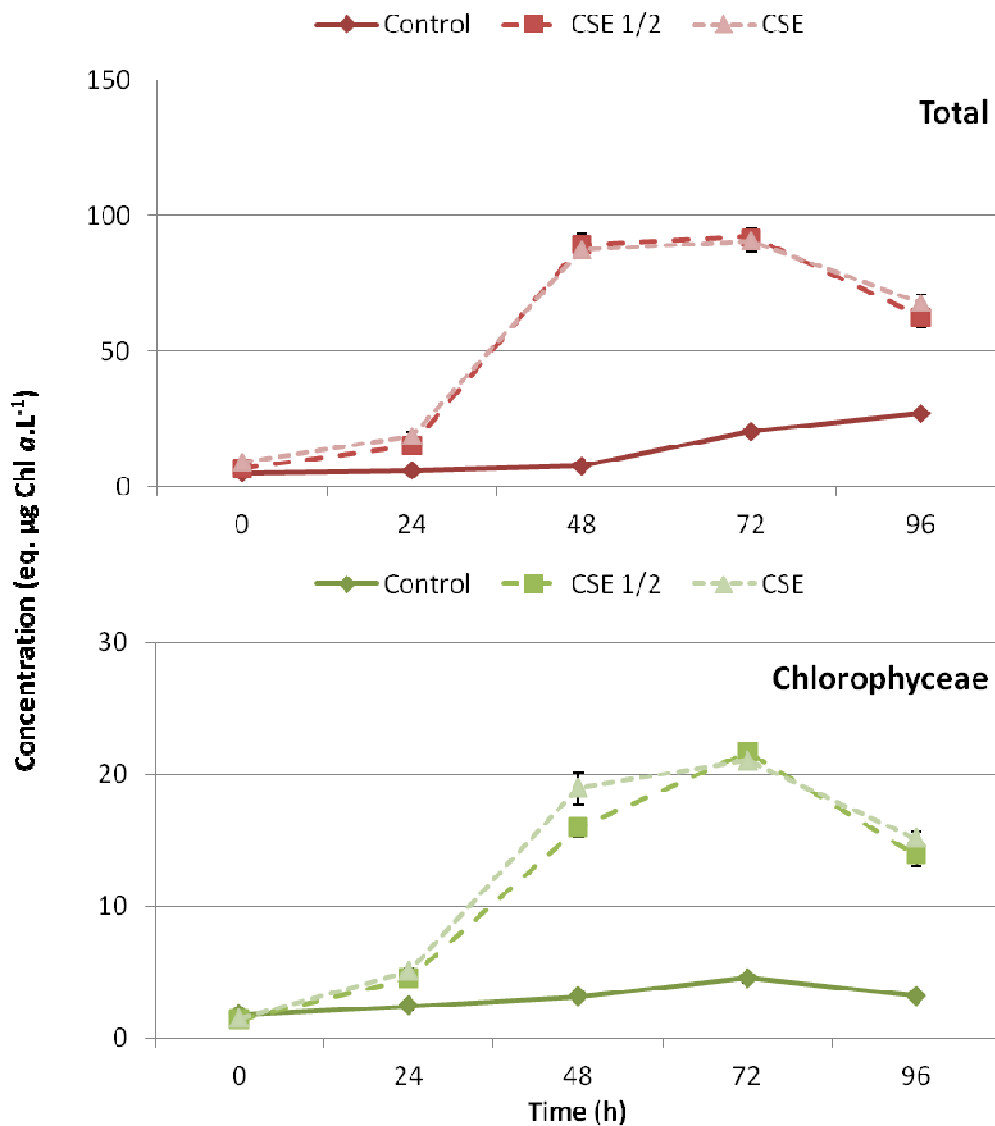
	df	MS	F	P	Tukey's results
A - F_v/F_m					
Treatment	2	0.00090	1.58	0.216	Control CSE½ CSE
Time	5	0.21861	382.97	0.000	t0 t5 t1 t4 t2 t3
Treatment x Time	10	0.00549	9.62	0.000	
Error	50	0.00057			
B - Φ_{PSII}					
Treatment	2	0.001311	6.63	0.003	Control CSE CSE½
Time	5	0.023368	118.22	0.000	t0 t5 t1 t4 t2 t3
Treatment x Time	10	0.002293	11.60	0.000	
Error	50	0.000198			
C - Chl <i>a</i>					
Treatment	2	12358.75	245.097	0.00	Control CSE½ CSE
Time	5	11212.18	222.358	0.00	t0 t1 t2 t5 t4 t3
Treatment x Time	10	1989.53	39.456	0.00	
Error	50	50.42			

Tukey's results are presented in increasing order (from left to right) and items underlined are not significantly different ($P \geq 0.05$).

VII.3.4. Phytoplankton groups discriminated by fluorometry

The main taxonomic groups determined with the FluoroProbe together with their contribution to the global phytoplankton biomass are shown on Figure VII.3. Concentrations of total biomass, Chlorophyceae, Cyanophyceae, and Diatomophyceae/Dinophyceae significantly differed according to both treatment and time (ANOVA; $P < 0.05$).

Total biomass concentrations ranged from 5.01 ± 0.11 (Control, at the beginning of incubation) to 92.10 ± 3.47 eq. $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ 285 (CSE½, after 72 h of incubation). Chlorophyceae concentrations ranged from 1.38 ± 0.04 (CSE½, incubation time) to 21.63 ± 0.63 eq. $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ (CSE½, after 72 h of incubation). Cyanophyceae concentrations ranged from 0 (Control, after 72 and 96h of incubation; CSE½, after 48 and 72 h of incubation) to 5.76 ± 0.65 eq. $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ (CSE, after 24 h of incubation). Concentrations of the “Diatomophyceae/Dinophyceae” group ranged from 0.21 ± 0.03 (Control, at the beginning of incubation) to 71.82 ± 3.48 eq. $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ (CSE½, after 48h of incubation). By contrast, no significant differences were observed between treatments and times for Cryptophyceae (ANOVA; $P \geq 0.05$).



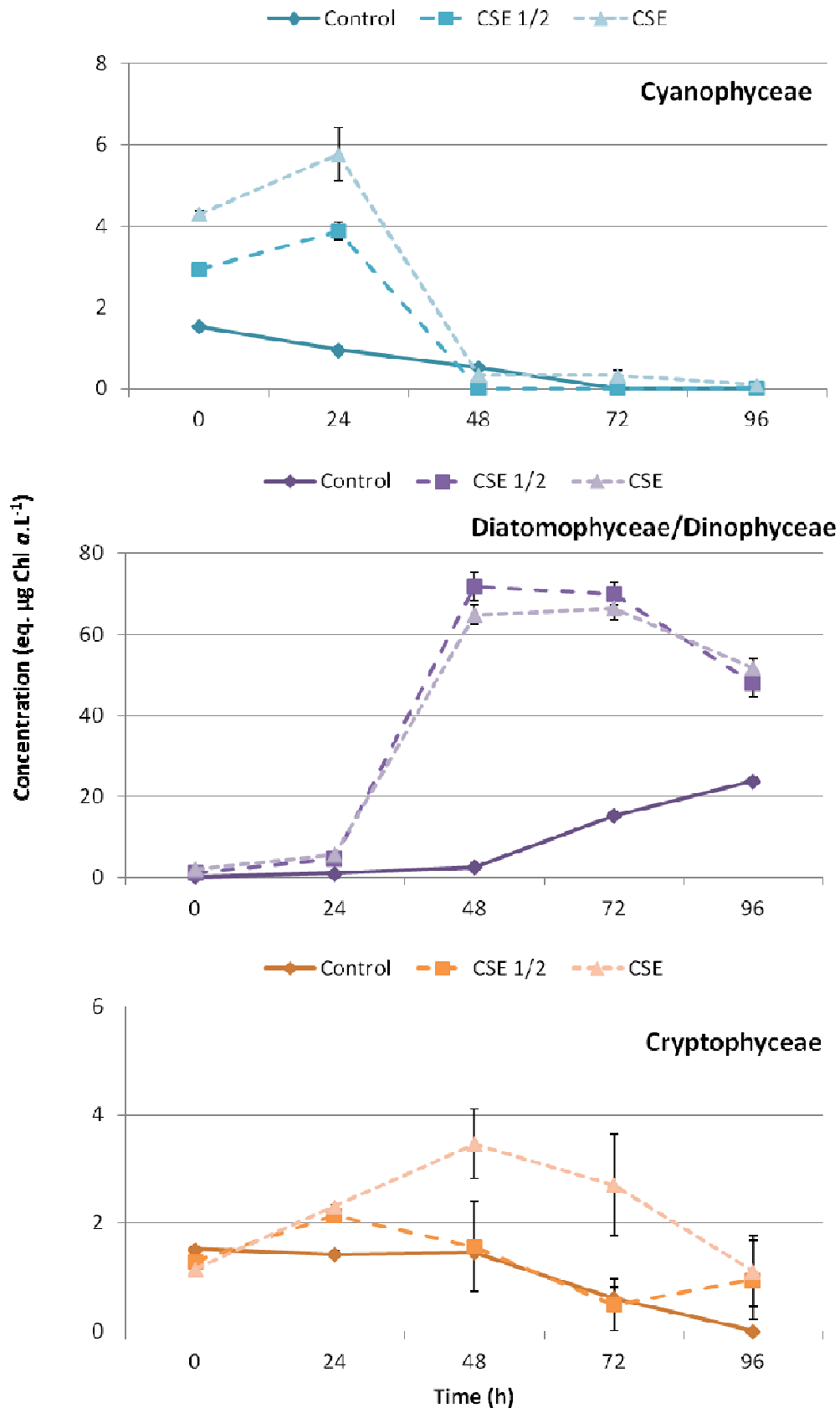


Figure VII.3. Temporal evolution of the total phytoplankton biomass (Chl *a*) and the main taxonomic groups (i.e., Chlorophyceae, Cyanophyceae, Diatomophyceae/Dinophyceae and Cryptophyceae) in the different microcosms (Control, CSE½ and CSE; mean \pm SE; in eq. $\mu\text{g Chl } a \cdot \text{L}^{-1}$). Data obtained with the FluoroProbe.

VII.3.5. Chemotaxonomic data

The temporal evolution of the phytoplankton community structure within the different microcosms, determined by HPLC chemotaxonomic approach, is showed on Figure VII. 4. At the beginning of incubation, Dinophyceae were dominant in the Control microcosms (30 %) whereas they only represented a low proportion of the community in elutriate-treated microcosms (3-7 %; dominance of the “others” group). At the end of incubation, Diatomophyceae were dominant in all microcosms, accounting for around 60 % of the total community. Dinophyceae constituted the second most abundant group ($\approx 10\%$). Cyanophyceae almost disappeared over time in all microcosms whereas Ditaomophyceae exhibited a high increase. Figure VII.5 shows the evolution of the size structure of phytoplankton communities determined from the pigment-derived criteria approach of Vidussi *et al.* (2001). No clear differences among microcosms were found. Whereas microphytoplankton and picophytoplankton were co-dominant at the beginning of the experiment, at the end, microphytoplankton was the only dominant group ($>90\%$).

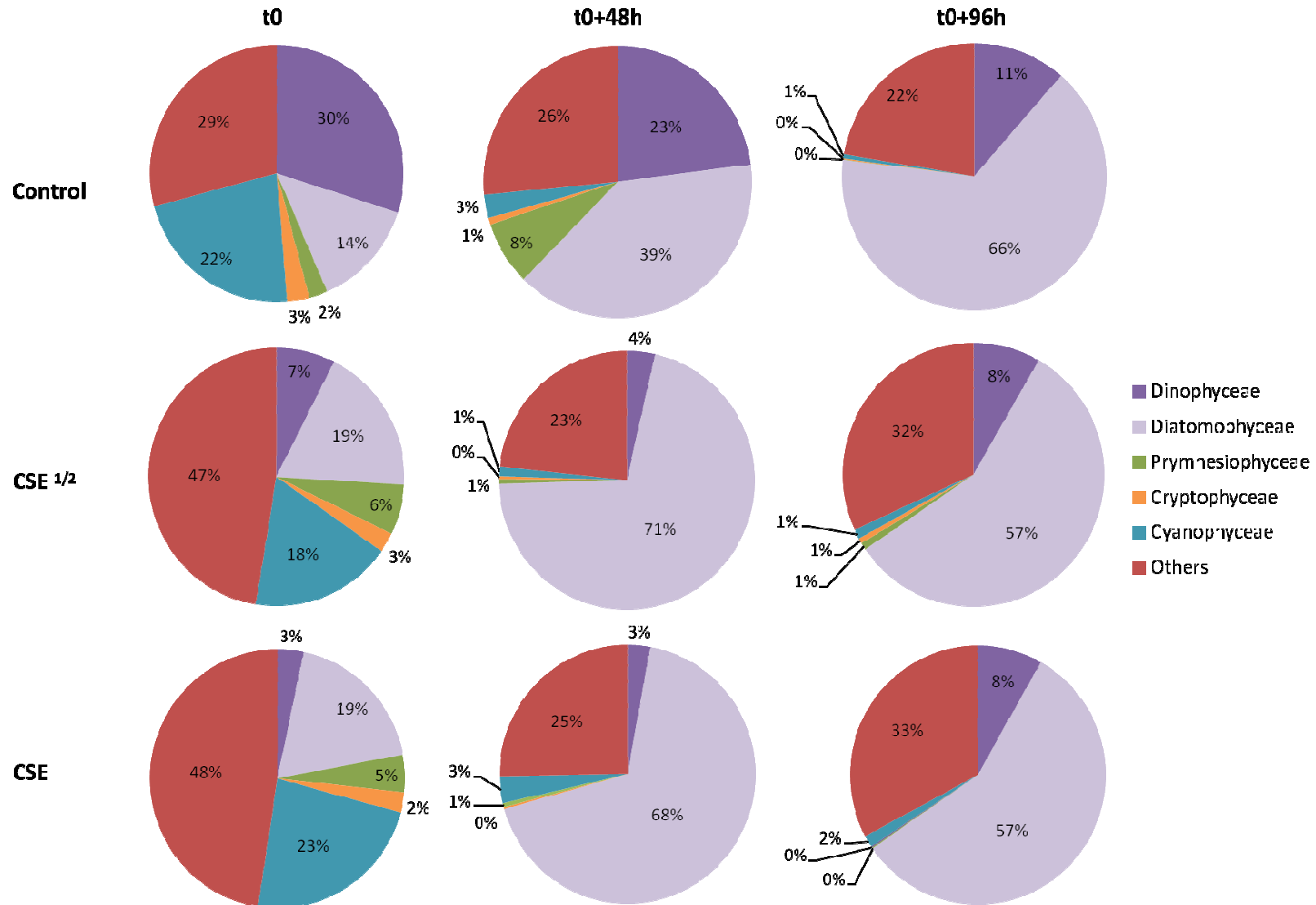


Figure VII.4. Contribution (expressed in percent) of the various phytoplankton groups to total Chl *a* biomass, obtained by HPLC analysis of diagnostic pigment signatures, in the different microcosms (control, CSE_{1/2}, CSE) and at different incubation times (t0: incubation time; t0+48h: 48h after t0; t0+96h: 96h after t0).

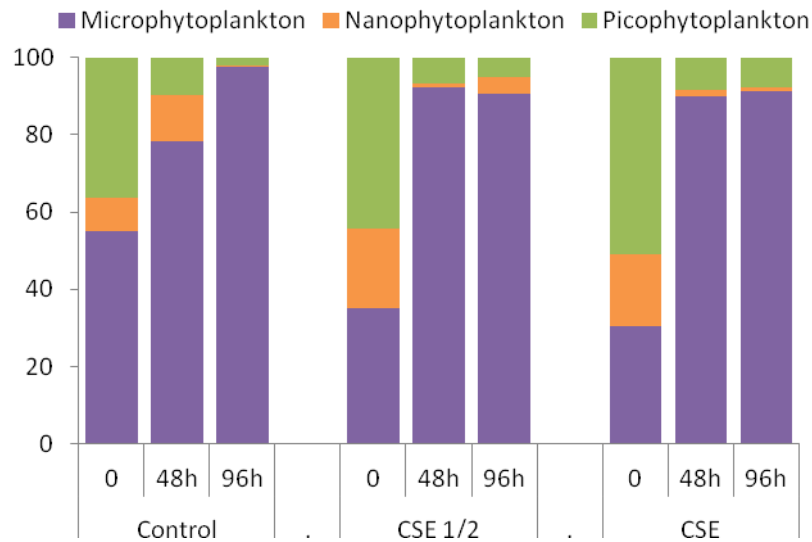


Figure VII.5. Size structure of phytoplankton communities, at the beginning of incubation (0) and after 48h and 96h of incubation, in the different microcosms (Control, CSE ½ and CSE). Data obtained by HPLC analyses of pigments and following the Vidussi *et al.* (2001) approach.

VII.3.6. Microscopy data

The initial phytoplankton inoculum was dominated by the Dinophyceae *Prorocentrum micans* (more than 90% of total counts). Two other Dinophyceae species were also present (i.e., *Alexandrium* sp and *Protoperidinium* sp; < 3 %). Few undetermined species of Diatomophyceae and Cyanophyceae were also found. At the end of the experiment, microscopic analyses showed that control and CSE microcosms were still dominated by Dinophyceae species (mainly *Prorocentrum micans* and *Protoperidinium* sp.), whereas CSE½ microcosms were co-dominated by Dinophyceae (mainly *Prorocentrum micans* and *Protoperidinium* sp) and Diatomophyceae (mainly *Diatoma* sp and *Navicula* sp) species.

VII.3.7. Flow cytometry data

Despite significant noise that was likely to be induced by debris from sediment elutriates, six phytoplankton groups were distinguished by flow cytometry. Picoplankton was differentiated from nanoplankton through the forward scatter signal (FSC; FSCpicoplankton < FSC 2µm-beads; FSCnanoplankton > FSC 2µm-beads). Picoplankton cells with low FL3 red fluorescence (produced by Chl *a*), no FL2 orange fluorescence (induced by phycoerythrin), and a bright FL4 red fluorescence (induced by phycocyanin) were classified as phycocyanin-rich picocyanobacteria (Figure VII.6), as in the study of Bec *et al.* (2011). A *Synechococcus*-like Cyanophyceae group was discriminated by its low FSC (< FSC2µm-beads) and high

orange fluorescence (phycoerythrin-rich cells). An unidentified group of cells exhibited very low FL3 red fluorescence, no FL2 orange fluorescence, high side scatter signal (SSC) but low FSC (unidentified picoplankton group). An eukaryotic nanophytoplankton group was spotted by its high FSC (> FSC 2µm-beads), high FL3 red fluorescence intensity, and absence of FL2 fluorescence. Additionally, two minority groups (only found in few samples) were detected: a picophytoplankton group (characterized by low FSC, low FL3 red fluorescence that was however brighter than for Cyanophyceae and no FL2 orange fluorescence) and an unidentified group (only resolved once, characterized by low FSC, intermediate FL3 red fluorescence between Cyanophyceae and nanophytoplankton, and no FL2 fluorescence).

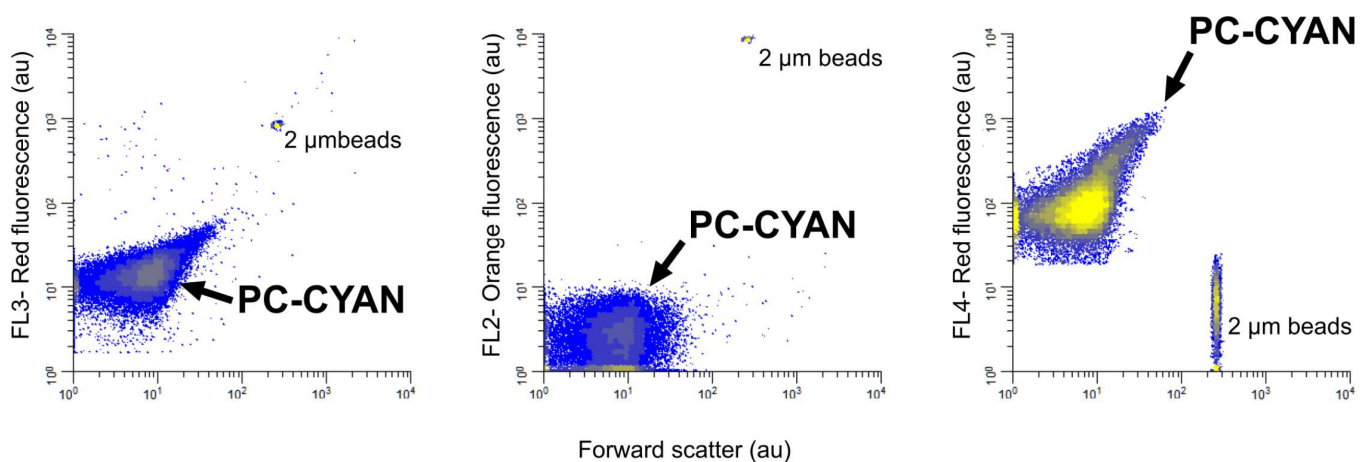
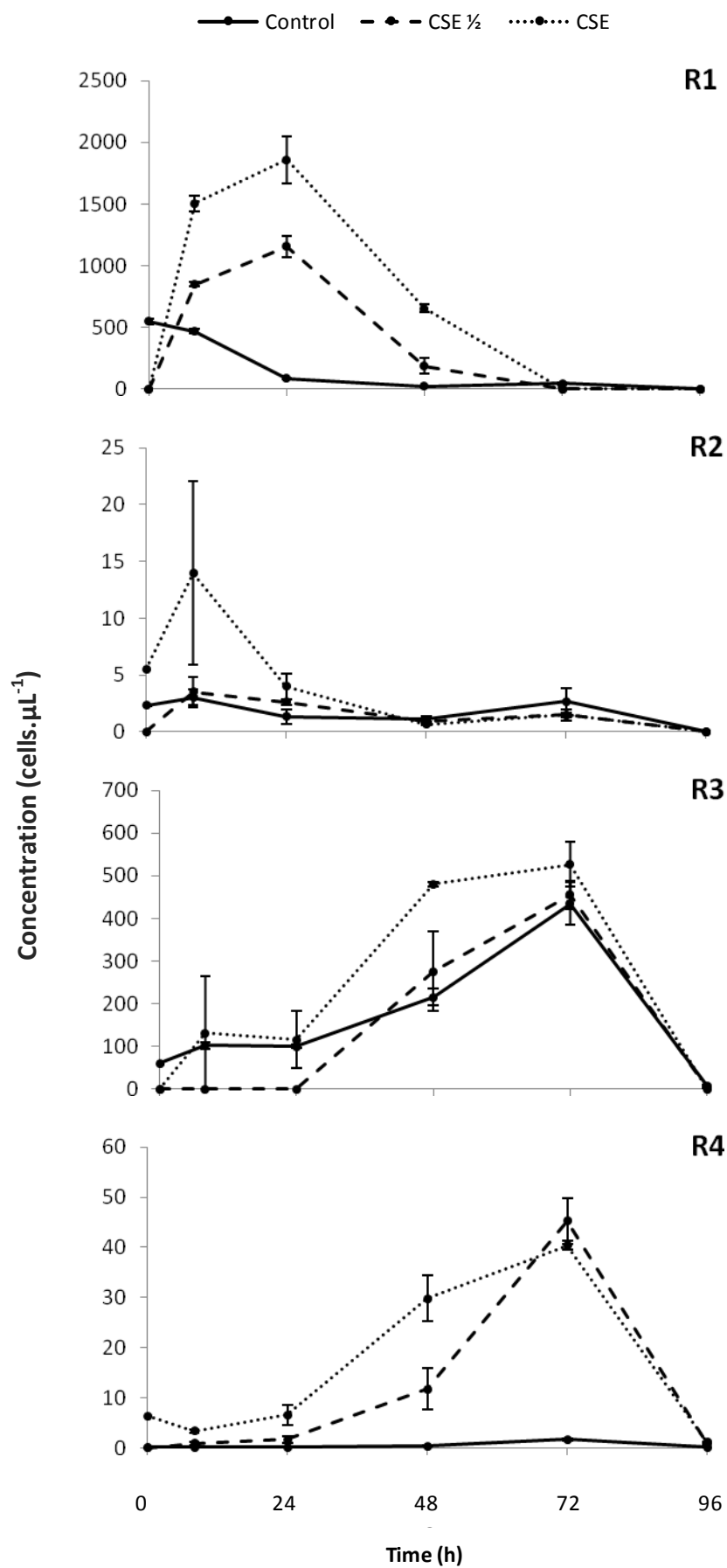


Figure VII.6. Cytograms showing the phycocyanin-rich picocyanophyceae group (PC-CYAN) composed of small-size cells (< FSC 2µm-beads) that exhibited a weak orange fluorescence signal after excitation by the 488 nm laser beam (signal related to phycoerythrin content) and a high red fluorescence intensity after excitation by the 635 nm diode laser (signal related to phycocyanin content).

Figure VII.7 shows the evolution, over time, of the four main identified groups (i.e., R1 to R4). The concentrations of phycocyanin-rich picocyanophyceae and eukaryotic nanophytoplankton were significantly higher in elutriate-treated microcosms than in control ones ($P < 0.05$). Whereas differences occurred during the first hours of incubation (from 8 to 48 h) for phycocyanin-rich picocyanophyceae; for eukaryotic nanophytoplankton, they occurred during the last ones (from 48 to 72 h of incubation). The concentrations of *Synechococcus*-like Cyanophyceae and of the unidentified picoplankton group were globally similar among microcosms throughout the experiment (only few significant differences were found).

Figure VII.7. Dynamics of the four main clusters identified by flow cytometry (R1: phycocyanin-rich picocyanophyceae; R2: *Synechococcus*-like cyanophyceae; R3: unidentified picoplankton group; R4: eukaryotic nanophytoplankton) in the different microcosms (Control, CSE½ and CSE; mean \pm SE; in cells. μL^{-1}).



VII.4. Discussion

The contaminant concentrations measured in the sediment of Biguglia point out a multiple contamination, by trace-metals and PAHs. Comparing with other lagoons of the world (see Accornero *et al.*, 2008), the trace-metal concentrations were in the range of those found in industrial and densely populated areas, such as the Gulf of Lion (South of France), pointing up a moderate/high contamination (Ni contamination appeared particularly high). With a total PAH concentration of $869 \mu\text{g.kg}^{-1}$, the PAH contamination can be qualified as moderate from the levels assigned by Baumard *et al.* (1998). According to the guideline values established by Long *et al.* (1995; i.e., ERL “effects range-low” and ERM “effects range-medium” values), the trace-metal and PAH contamination of the Biguglia sediment could induce adverse impacts to biota. Indeed, with concentrations ranging between the ERL and ERM values, Cr (trace-metal), Cu (trace-metal), Ace (PAH) and Flr (PAH) were considered to be able to occasionally cause adverse biological effects ($\text{ERLCr} = 81$ and $\text{ERMCr} = 370 \mu\text{g.g}^{-1}$; $\text{ERLCu} = 34$ and $\text{ERMCu} = 270 \mu\text{g.g}^{-1}$; $\text{ERLAce} = 16$ and $\text{ERMAce} = 500 \mu\text{g.kg}^{-1}$; $\text{ERLFlr} = 19$ and $\text{ERMFlr} = 540 \mu\text{g.kg}^{-1}$; Long *et al.*, 1995). As for Ni, with a concentration above the ERM threshold value ($\text{ERMNi} = 51.6 \mu\text{g.g}^{-1}$; Long *et al.*, 1995), it was considered to be able to frequently cause adverse biological effects. As far as sediment elutriates are concerned, several trace metals (As, Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn) and PAHs (Flt, BaA, Chry, BbF, BkF, BaP, BghiP, and Ind) were detected, pointing up a multiple contamination.

Results obtained with the FluoroProbe and the PHYTO-PAM instruments are consistent and point out growth stimulations in both elutriate-treated microcosms. Previous research reported phytoplankton biomass decrease after exposure to chemicals: e.g., trace metal Zn (for concentrations similar to ours; Rochelle-Newall *et al.*, 2008), herbicide paraquat (concentrations tested: 10 and $40.5 \mu\text{g.L}^{-1}$; Leboulanger *et al.*, 2011), crude oil (at high concentrations, $\geq 2.28 \text{ mg.L}^{-1}$; Huang *et al.*, 2011). By contrast, other studies either report no phytoplankton biomass change (e.g., insecticide fenitrothion at concentrations of 10 and $100 \mu\text{g.L}^{-1}$; Leboulanger *et al.*, 2011), or, as in our study, biomass increase (e.g., herbicide diuron at concentrations of 2.2 and $11 \mu\text{g.L}^{-1}$, Leboulanger *et al.*, 2011; crude oil at low doses, Huang *et al.*, 2011), after chemical exposure.

According to the hormesis concept that stipulates that chemicals have stimulatory effects at low concentrations while being inhibitory at higher doses (Calabrese & Blain, 2004; Calabrese, 2005), the growth increase that we observed in elutriate-treated microcosms may result from low-dose stimulation phenomena. Such stimulation would reflect the capacity of the biological system to allocate resources in a highly efficient manner during reparative processes (Calabrese, 2008). In other words, under low disturbance, organisms would not only repair any damage, but would also overcompensate and reduce background damage more effectively (Chapman, 2002).

Furthermore, among the main chemical compounds found in elutriates, and hence likely to induce effects on phytoplankton community, are essential micronutrient metals (i.e., Cu, Ni and Zn). Contrary to non-essential trace-metals (e.g., As, Cd, Hg, and Pb), that may interfere with proper functioning of enzymes and associated cofactors, these elements are involved in protein structure stabilization, facilitate electron transfer reactions or catalyze enzymatic reactions (Torres *et al.*, 2008). For example, Cu, Fe, and Zn play key roles in photosynthetic electron transport within thylakoids (Raven *et al.*, 1999). However, even if some trace-metals are essential for metabolic and biological processes, above threshold levels, they may also induce deleterious effects. A recent study on phytoplankton communities indeed showed that Co, Ni, Cu, and Zn induced growth stimulation at low levels (e.g., for Cu: from 0.06 to 31.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$) but opposite effect at high levels (e.g., for Cu: $\geq 63.5 \mu\text{g.L}^{-1}$; Chakraborty *et al.*, 2010). The growth increase we observed in elutriate-treated microcosms may then also result from stimulation by the essential metals that occurred at low levels in elutriates (i.e., Cu, Ni, and Zn).

Throughout the experiment, the photosynthetic performance of communities, assessed from the Fv/Fm and ϕPSII parameter measurements, was quite similar among microcosms. Fv/Fm values reached a maximum of 0.54 in control and 0.61 in elutriate-treated microcosms after 48 h of incubation, indicating a good physiological state of communities at that time (Maxwell & Johnson, 2000). Surprisingly, ϕPSII values remained very low in all microcosms and throughout the experiment (< 0.27), suggesting a weak light-utilization efficiency (Maxwell & Johnson, 2000). Such high differences between Fv/Fm and

ϕ PSII values have equally been reported in a study equally conducted in the Biguglia lagoon (Garrido *et al.*, 2013).

The fact that the photosynthetic performance of communities was quite similar among microcosms and throughout the experiment suggests that elutriate exposure did not alter the photosynthetic efficiency of phytoplankton cells. Yet, previous studies on algae and aquatic plants reported decreases of photosynthetic activity following chemical exposures (e.g., Pérez *et al.*, 2006; Macinnis-Ng & Ralph, 2004). Such results were generally explained by disruptions or damages caused on the photosynthetic apparatus. Nevertheless, it has been demonstrated that microalgae may employ a variety of biochemical strategies to cope with chemical toxicity before any damage occur (Torres *et al.*, 2008). For example, Morelli *et al.* (2009) showed that, after exposure to metal-contaminated elutriates, diatoms may synthesize phytochelatins, cysteine-rich polypeptides involved in metal chelation mechanisms (Grill *et al.*, 1985; Cobbett, 2000), before disruptions occurred. Therefore, it cannot be ruled out that elutriate-exposed phytoplankton cells used defense mechanisms to sustain their photosynthetic performance.

In this study, we used different methods (HPLC chemotaxonomy, microscopy, flow cytometry) to detect possible effects of contaminated elutriates on the phytoplankton community structure because, as highlighted by Stachowski-Haberkorn *et al.* (2009), none method alone can provide a full overview of structural changes that are likely to occur after chemical exposure. Microscopy analysis is the most accurate method to study phytoplankton community structure of large cells, but it is highly time-consuming. Flow cytometry, allowing to study small phytoplankton cells (<20 μ m; i.e., picophytoplankton and nanophytoplankton; Collier & Campbell, 1999), is complementary to HPLC and microscopy analyses to investigate possible structural changes.

Regarding the global size structure of the communities, any substantial difference among microcosms was found from chemotaxonomic analysis. In control, as in treated microcosms, a shift of dominance from nano- and picophytoplankton to microphytoplankton was observed over time; it is however noteworthy that this shift occurred more quickly in elutriates than in control microcosms. This result contrasts with several studies which reported a shift in size structure toward smaller sizes after exposure of phytoplankton to

chemicals: e.g., trace metal As (Sanders and Cibik, 1988), trace metal Cu (shifts observed for concentrations $\geq 20 \mu\text{g.L}^{-1}$; Pérez *et al.*, 2006), pesticides (in particular paraquat; Leboulanger *et al.*, 2011).

Furthermore, whereas HPLC pigment analysis pointed out a dominance of Diatomophyceae in all microcosms at the end of the experiment, microscopic analysis revealed a dominance of Dinophyceae species (mainly *Prorocentrum micans* and *Protoperidinium* sp) in control and CSE microcosms, and a co-dominance of Dinophyceae (mainly *Prorocentrum micans* and *Protoperidinium* sp) and Diatomophyceae (mainly *Diatoma* sp and *Navicula* sp) species in CSE½ microcosms. However, it cannot be ruled that results from chemotaxonomy analysis may be partly biased as pigment composition of Dinophyceae may widely vary. Indeed, autotroph species contain high levels of peridinin whereas heterotroph species do not contain peridinin but high levels of fucoxanthin, 19'-hexanoyloxyfucoxanthin and 19'-butanoyloxyfucoxanthin; Nelson, 1989; Wright *et al.*, 1991). Abundance of Dinophyceae could thus have been underestimated with the chemotaxonomy approach. Flow cytometry results show that changes occurred within the pico- and nanoplankton compartment after elutriate exposure. Phycocyanin-rich Cyanophyceae immediately increased after elutriate exposure. Then, after 24 h of exposure, while phycocyanin-rich cyanophyceae started to decrease, the eukaryotic nanophytoplankton increased. Therefore, even if elutriates did not appear to induce changes in the global community structure, they induced shifts in the composition of the small cell compartment. Similar reverse responses were observed on marine phytoplankton community exposed to the fungicide Opus at $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ with (decrease of the Prasinophyceae-like populations and increase of *Synechococcus* populations; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2009).

It is noteworthy that, together with contaminants, nutrients can be released during sediment resuspension events. Recent studies showed that interactive effects between contaminants and nutrients may occur. For example, Riedel *et al.* (2003) found that trace elements reduced nutrient stimulation on phytoplankton. In this study, we compensated the levels of ammonium so that this limiting nutrient was present in approximately similar concentrations in all microcosms but we did not for others nutrients, and NO_2^- , H_3PO_4^- and SiO_4^{3-} were found in higher concentrations in elutriate-treated microcosms in relation to

control ones. Hence, the nutrient enrichment that resulted from the resuspension 469 process may also have contributed to the phytoplankton responses we observed, the functional as the structural ones. It cannot be ruled out, for example, that nutrients reduced toxicity of contaminants through counteracting mechanisms, as it has been observed by Miao & Wang (2006). Even if investigating the contaminant-nutrient interactive effects represents a hard task because of the complexity of data interpretation, such approach would allow to further enhance our understanding of the impacts of contaminated sediment resuspension on pelagic communities.

In summary, the results of this study show that exposure of natural phytoplankton community to sediment elutriates lowly contaminated by trace-metals and PAHS induced important changes, on the functional level as on the structural level. Indeed, elutriates highly stimulated growth after 24 h of exposure, slightly stimulated photosynthesis at first before inhibiting it, and induced structural shifts within the small cell compartment ($< 20 \mu\text{m}$). Contamination of the water column through sediment resuspension is thus likely to induce functional and structural changes within the phytoplankton communities, and may therefore influence global plankton dynamics in shallow coastal ecosystems.

The phytoplankton responses we observed in this study were rather different from those observed in single-contaminant tests (cf. the above paragraphs of the discussion). This highlights that the effects of contaminants in mixture may differ from the effects of contaminants alone, and further evidences the necessity to study the responses of organisms under exposure to mixture of contaminants for a better understanding and prediction of the impact of environmental contamination on phytoplankton communities.

CHAPITRE VIII

Synthèses et perspectives



VIII.1. Considérations méthodologiques

Quatre outils et techniques différents ont été utilisés pour ces travaux de recherche: la microscopie photonique, l'HPLC, la spectrofluorimétrie *in situ* et *in vivo* (FluoroProbe, bbe moldaenke), dans le but de suivre la dynamique et les successions saisonnières des communautés phytoplanctoniques dans deux écosystèmes côtiers en Corse (milieu marin et milieu lagunaire), ainsi qu'un fluorimètre PAM (Phyto-PAM, Heinz Walz GmbH) qui nous a permis d'estimer les biomasses phytoplanctoniques et d'en caractériser l'efficacité photosynthétique dans une lagune eutrophisée en Corse.

La microscopie nous a permis d'obtenir des informations très précises, tant sur l'aspect qualitatif que quantitatif, principalement des espèces appartenant à la classe de taille du microphytoplancton. Cependant, nous avons été rapidement confrontés à la difficulté de cet exercice d'identification. En effet, toutes ces analyses microscopiques font appel à des spécialistes de la taxonomie, et certaines identifications d'espèces passent obligatoirement par la microscopie électronique à balayage. La reconstitution de la composition taxonomique à partir de la signature pigmentaire du phytoplancton (HPLC), nous a offert de nombreux avantages. Ces analyses ont rendu possible la (i) quantification et l'identification des micro-algues jusqu'à la classe et (ii) la détermination des biomasses respectives associées aux différentes classes de taille [micro-, nano- et picophytoplancton (Vidussi *et al.*, 2001 ; Uitz *et al.*, 2006). L'utilisation de la spectrofluorimétrie *in situ* et *in vivo*, a été un atout pour l'estimation rapide de la biomasse phytoplanctonique. Alors que l'emploi de la fluorimétrie PAM a constitué un estimateur quantitatif de la biomasse phytoplanctonique active et a permis d'en caractériser l'efficacité photosynthétique.

VIII.1.1. Recommandations d'utilisation du Phyto-PAM

La méthode de fluorimétrie PAM a été développée par Schreiber *et al.* (1986) dans le but de mesurer le taux de transfert des électrons à partir du rendement de fluorescence au niveau du PSII. Les fluorimètres PAM soumettent les organismes photosynthétiques à un éclairage modulé ce qui engendre une fluorescence modulée. Cette fluorescence se distingue de la fluorescence naturelle par un système de filtres. Pour s'affranchir de certains phénomènes, la fluorimétrie PAM est associée à la méthode des flashes de saturation

(*Sat-Pulse*), qui permet de différencier les variations du niveau de fluorescence ou quenching photochimique et nonphotochimique. Le Phyto-PAM est un fluorimètre qui utilise des impulsions lumineuses générées par un ensemble de diodes électroluminescentes (LED) afin d'exciter les pigments chlorophylliens présents dans l'échantillon. La technique PAM a donc ouvert de nouvelles possibilités pour évaluer l'état physiologique du phytoplancton. Nous avons testé certaines limites d'utilisation du Phyto-PAM, notamment lors de mesures effectuées sur des échantillons naturels conservés à des températures élevées et durant une longue période. Classiquement, il est recommandé de réaliser des mesures sans délai après leur collecte, mais le nombre d'échantillons et les méthodes d'analyse nécessaires pour obtenir des ensembles de données précieuses rendent parfois impossible le traitement immédiat, causant ainsi des retards entre les différentes mesures. Le but de cette étude (Chapitre III) était d'évaluer les effets des conditions de conservation sur les paramètres photosynthétiques de différentes communautés phytoplanctoniques naturelles échantillonnées au cours de l'été 2010, dans différentes stations d'une lagune méditerranéenne (Biguglia). Les paramètres liés à la fluorescence PAM ont été mesurés après trois durées de conservation différentes (entre 2 h et 4 h, entre 6 h et 8 h et entre 10 h et 12 h après le prélèvement) sur des échantillons stockés à trois températures différentes (15 °C, 25 °C et 35 °C). L'absence d'écarts significatifs au cours de la journée pour les échantillons conservés à 15 °C a suggéré que les caractéristiques de fluorescences des échantillons n'auraient pas plus évolué au cours du décalage dans le temps d'échantillonnage et de séparation de la première série de mesures effectuées dans la matinée. Nous recommandons donc ce type de stockage et de stratégie de conservation, même pour des durées relativement longues. Les résultats ont également montré que le stockage à la température la plus élevée (35 °C) a gravement altéré la mesure des paramètres photosynthétiques, avec, de plus, des effets cumulatifs engendrés par la durée de stockage. La conservation à "*température ambiante*" (25 °C) apparaît comme une option valable si des mesures doivent être effectuées uniquement dans un délai très court. Pour conclure, la conservation des échantillons à 15 °C reste la meilleure solution lorsque le temps entre les prélèvements et les analyses dépassent les 4 heures. Cependant le stockage à long terme (> 8 h) devrait définitivement être évité.

VIII.1.2. Validation de l'utilisation de la FluoroProbe® dans les zones côtières en Méditerranée

Durant ce travail de thèse, nous avons également testé et validé l'utilisation de la sonde immergeable spectrofluorométrique FluoroProbe®, dans des écosystèmes côtiers méditerranéens, au regard de la relation des mesures obtenues par HPLC (technique la plus couramment employée), mais également comparé les mesures enregistrées par la FP *in situ* et *in vivo* (Chapitre IV). Les données actuelles, favorisant l'utilisation de la sonde immergeable spectrofluorométrique pour l'étude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques, doivent être toutefois complétées par d'autres mesures, notamment en milieu marin, afin de confirmer avec précision les relations rencontrées durant cette étude.

Nous avons tout de même pu mettre en évidence des relations linéaires fortes pour la concentration en Chl *a* et le groupe des Diatomophyceae et Dinophyceae, aussi bien pour les mesures *in situ* qu'*in vivo*. Pour le groupe des Chlorophyceae et des Cyanophyceae les corrélations sont positives, mais moins évidentes. Et aucune corrélation n'a été confirmée pour les Cryptophyceae. Les relations linéaires pour ces 3 derniers groupes (Chlorophyceae, Cyanophyceae et Cryptophyceae) sont plus élevées lors des mesures effectuées *in vivo* par rapport à celles effectuées *in situ*. La cause de ces faibles corrélations et/ou de l'absence de corrélation entre les mesures de la FluoroProbe et les analyses HPLC pourrait être expliquée par l'hétérogénéité des communautés phytoplanctoniques (espèces différentes en milieu marin et lacustre) et par l'utilisation de la sonde avec une calibration d'usine (concernant les espèces et la matière organique dissoute colorée ou CDOM). Afin d'améliorer ces résultats, la calibration avec des espèces représentatives de la région pourrait être réalisée ainsi que l'examen des concentrations en CDOM, comme le proposent Richardson *et al.* (2010) et Lawrenz *et al.* (2010). Ces changements permettraient de suivre l'évolution globale d'une population ou d'un groupe fonctionnel. En résumé, nos résultats montrent que la FluoroProbe, sans calibration spécifique, fournit de bonnes estimations de la biomasse de phytoplancton (exprimée en termes de Chl *a*) et de la composition de la communauté phytoplanctonique (Diatomophyceae, Dinophyceae, Cyanophyceae et Chlorophyceae) pour des suivis à grande échelle dans les écosystèmes côtiers. La FluoroProbe semble être un outil utile pour la surveillance du phytoplancton, en tant que système d'alerte précoce pour la

détection des efflorescences phytoplanctoniques nuisibles. Elle pourrait également permettre d'augmenter la fréquence d'échantillonnage dans le cadre de suivis spécifiques. Dubelaar *et al.* (2004) ont montré qu'une fréquence d'échantillonnage hebdomadaire constitue une échelle d'observation minimale pour suivre les périodes de blooms. Cependant, il serait préférable de conserver l'identification et la quantification par microscopie, afin de pouvoir vérifier la proportion des grandes classes phytoplanctoniques présentes ainsi que les espèces potentiellement problématiques et ayant tendance à former des efflorescences (notamment les espèces appartenant aux classes des Cyanophyceae, des Dinophyceae et dans une moindre mesure des Diatomophyceae). Il faut tout de même garder à l'esprit que ce type d'outils présente quelques limites, notamment en cas de forte turbidité dans le milieu où la transmission du signal peut être parfois mauvaise (Rolland, 2009 ; Lawrenz *et al.*, 2010). De plus, la mesure la plus répandue dans la littérature concernant le phytoplancton et plus particulièrement l'évolution de son abondance, est la quantification de la Chl *a*. Ce pigment est généralement considéré comme un bon représentant de la biomasse algale, puisqu'il est présent chez toutes les micro-algues (Jeffrey *et al.*, 1997). Cependant certains scientifiques considèrent que ce paramètre n'est pas forcément représentatif de la biomasse, puisque le contenu cellulaire en Chl *a* peut varier entre les espèces (Strickland, 1968), mais aussi en fonction des conditions du milieu (Kiefer, 1973), des apports en nutriments (Kruskopf & Flynn, 2006) et de l'éclairement (Rodríguez *et al.*, 2006). L'utilisation de la FluoroProbe, instrument relativement puissant et facile d'utilisation, dans le cadre de suivi régulier notamment lorsque que certaines espèces sont ciblées, est prometteuse mais doit encore faire l'objet de nombreux développements, particulièrement en zones côtières où les calibrations peuvent être complexes. D'autres outils sont régulièrement développés et mis sur le marché. Nous pouvons citer à titre d'exemple : Algae Torch (bbe moldaenke), Analyseur d'Algues en Ligne AOA (bbe moldaenke), MULTICOLOR PAM (bbe moldaenke ; BIONEF, Paris).

VIII.2. Apports scientifiques fondamentaux

VIII.2.1. Spécificités locales et similitudes dans la dynamique phytoplanctonique de deux écosystèmes contrastés marins côtiers en Corse

Bien que la Méditerranée soit typiquement considérée comme un système oligotrophe (Krom *et al.*, 1991 ; Antoine *et al.*, 1995), certaines régions sont caractérisées par une production primaire importante. Le but de l'étude présentée dans le chapitre V vise une meilleure connaissance de la variation spatio-temporelle des communautés phytoplanctoniques dans les écosystèmes marins côtiers. Á l'heure actuelle, de nombreux scientifiques travaillent sur l'établissement d'indices phytoplanctoniques robustes, rapides et reproductibles dans le cadre de la « *Water Framework Directive* », afin de permettre aux gestionnaires des milieux côtiers d'évaluer la qualité de leur masse d'eau et de pouvoir prendre le cas échéant des mesures de gestions adéquates. Cette simplification implique une connaissance approfondie du fonctionnement des zones étudiées et de leurs caractéristiques. Globalement, l'évolution saisonnière sur l'ensemble du bassin Nord-Ouest de la Méditerranée, est caractérisée par une floraison printanière et une floraison automnale (Figure VIII.1).

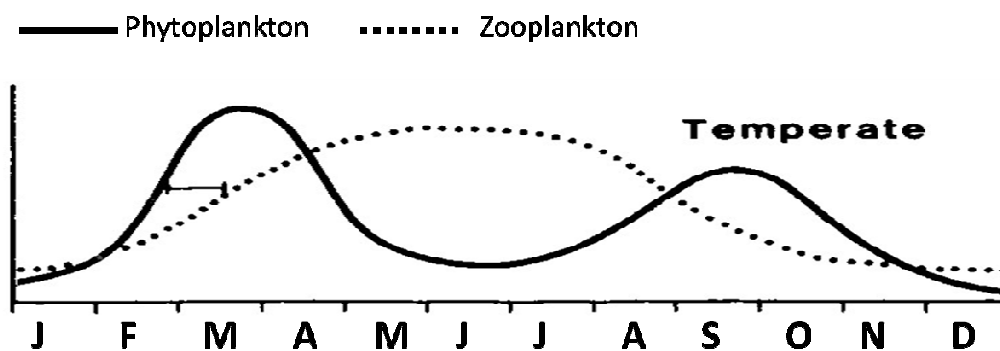


Figure VIII.1. Présentation schématique des variations saisonnières du phyto- et du zooplancton en mer tempérée (d'après Williams, 1984).

Cependant, des nuances apparaissent selon les sites d'étude (cf. Tableau V.1). L'observation de la succession phytoplanctonique sur nos deux sites coïncide avec la succession établie par Margalef (1958). Goffart *et al.* (2002) ont mis en avant une diminution progressive du taux de chlorophylle d'année en année durant les floraisons printanières, qui suivent la fertilisation hivernale (Lévy *et al.*, 1998). Cette diminution aurait pour principale cause les modifications du climat (e.g. modification du régime des vents le long de la côte

occidentale en Corse). À partir des concentrations en Chl *a* et des abondances phytoplanctoniques dans notre étude, nous avons pu définir un pic dans la baie de Calvi majoritairement représenté par les Diatomophyceae (*Chaetoceros*; Figure VIII.2). Cette efflorescence en période « hiver-printemps » correspond au mouvement vertical de la thermocline sous l'influence d'événements locaux comme : les upwellings, le vent et l'injection de nutriments induit par le front Liguro-Provençal.

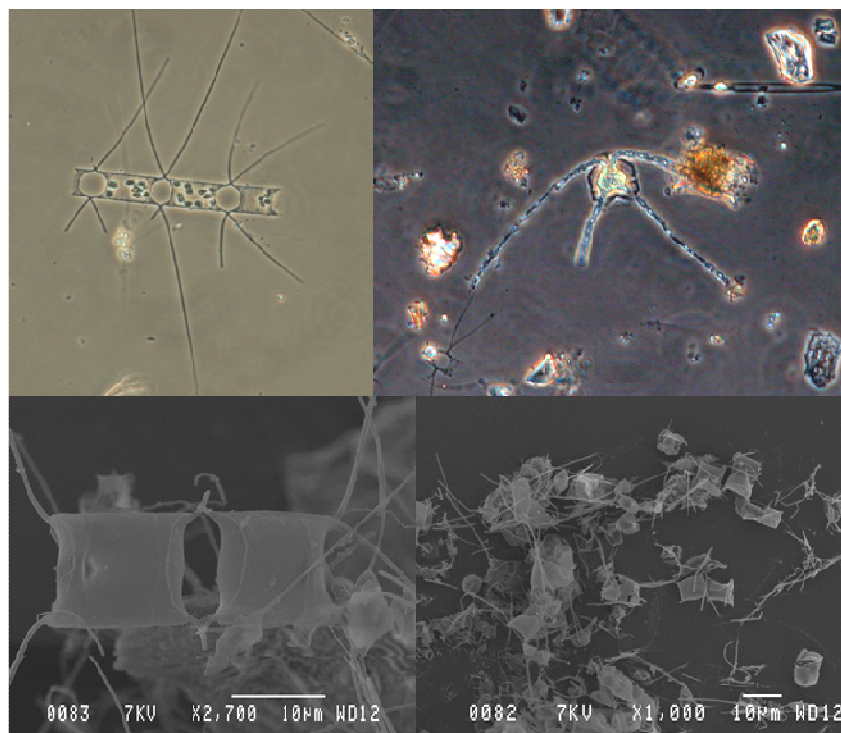


Figure VIII.2. Photographies de différentes espèces appartenant au genre *Chaetoceros* en microscopie photonique et en MEB (plate-forme de Microscopie Électronique du MNHN, Couté A. et Perrette C.).

Concernant la région Bastiaise, des floraisons successives ont été observées, notamment en période hivernale (Février ; *Chaetoceros*) et une pré-printanière (Mars ; Prymnesiophyceae appartenant au genre *Phaeocystis*). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, Goffart *et al.* (2000), Rousseau *et al.* (2002) et Larsen *et al.* (2004) ont démontré que les blooms printaniers de *Phaeocystis* sont co-occurents ou suivent les blooms de Diatomophyceae. Les communautés phytoplanctoniques rencontrées sur les deux sites étudiés ont présenté des différences au niveau de leur structure. En effet, nous avons pu noter une présence significative des Dinophyceae, sur le littoral Bastiais, inhabituelle au regard de la succession proposée par Margalef. De plus, durant la floraison printanière (maximum de biomasse) enregistrée en Mai 2010, les genres dominants

appartenait à la classe des Dinophyceae et sont considérés comme des genres nuisibles et/ou toxiques : *Dinophysis*, *Prorocentrum* et *Protoperdinium*. L'eutrophisation des eaux côtières a été mise en cause pour ce qui concerne l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des blooms pouvant avoir des conséquences nuisibles sur l'économie ou la santé humaine (Smayda, 1990). L'étang de Biguglia, situé à proximité de notre station d'échantillonnage sur le littoral de Bastia, est un écosystème confiné eutrophisé (Mouillot *et al.*, 2000). Les apports d'eaux lagunaires, riches en nutriments et en contaminants, induits par de fortes précipitations, pourraient expliquer la présence importante de Dinophyceae et de nanophytoplancton. Ces efflorescences ont un impact direct sur la structure des réseaux trophiques et les cycles biogéochimiques (Paerl, 1988 ; Sournia *et al.*, 1991a). Dans les eaux tempérées, le développement de Dinophyceae suit généralement le bloom printanier effectué par les Diatomophyceae, comme nous avons pu l'observer dans la baie de Calvi. En dépit de l'importance des Dinophyceae sur le littoral Bastiais, des diatomées ont été observées en automne et en hiver sur nos deux sites, avec des abondances et des récurrences plus importantes dans la baie de Calvi. La présence de Diatomophyceae est indicatrice d'une communauté phytoplanctonique en bon état (Chrétiennot-Dinet, 1998). Les genres rencontrés, durant cette période, possédant une stratégie écologique de type « r » (=maturation précoce, fort taux de croissance individuel, forte fécondité relative, descendants de petite taille, grand effort de reproduction et durée de vie courte), étaient *Asterionella*, *Chaetoceros*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* (Margalef, 1978). La limitation en ressources, au cours de la stratification thermique, altère l'échelle des taux métaboliques, résultant en une diminution de la taille des cellules phytoplanctoniques (Finkel, 2001 ; Finkel *et al.*, 2004). Cette limitation provoque ainsi une modification importante dans la structure de taille des communautés évoluant vers la dominance de petites formes comme les petits flagellés possédant une stratégie écologique de type « k » (=maturation tardive, taux de croissance individuel, fécondité relative et effort de reproduction faibles, descendants de grande taille, grande espérance de vie ; Margalef, 1978 ; Reynolds & Smayda, 1998 ; Smayda & Reynolds, 2001), pour lesquelles un rapport surface/volume (S/V) élevé, facilite l'absorption et l'assimilation des sels nutritifs et réduit le temps de développement (Kiorboe, 1995 ; Agawin *et al.*, 1998). Les Diatomophyceae qui ont été rencontrées en période estivale sur nos deux sites appartenaient aux genres *Guinardia*, *Leptocylindrus* et *Pseudo-nitzschia*. Rousseau *et al.* (2002) ont démontré que ces genres sont

faiblement silicifiés et présentent un rapport S/V élevé en raison de leur forme allongée. Ces espèces apparaissent donc particulièrement adaptées à de faibles concentrations en silicates et d'importantes floraisons ont déjà été observées en particulier lors de conditions limitantes en silice (Del Amo *et al.*, 1997 ; Fehling *et al.*, 2004). Ces différentes stratégies mises en place par les groupes phytoplanctoniques conduisent à la succession des communautés décrites pour les mers tempérées, où les Diatomophyceae démarrent le bloom printanier, suivies en général par les Prymnesiophyceae et finalement par les Dinophyceae une fois que la masse d'eau est stratifiée et donc limitée en nutriments.

De plus, nous avons relevé durant notre étude un manque de précision concernant les analyses HPLC comparativement aux données acquises par microscopie concernant la classe des Dinophyceae (Chapitre V). Notamment lorsque les espèces *Ceratium furca* et *Prorocentrum minimum* étaient présentes dans de fortes concentrations de biomasses (Figure VIII.3). De nombreux auteurs font référence aux différents comportements trophiques des Dinophyceae. En effet, ceux-ci peuvent être autotrophes, hétérotrophes exclusifs ou mixotrophes en fonction des conditions environnementales. Certains même sont capables d'assimiler directement la matière organique dissoute, par osmotrophie. Des espèces telles que *Ceratium furca* et *Prorocentrum minimum* ont été reconnues osmotrophes (Stoecker *et al.*, 1997 ; Lampert, 2001 ; Heil *et al.*, 2005).

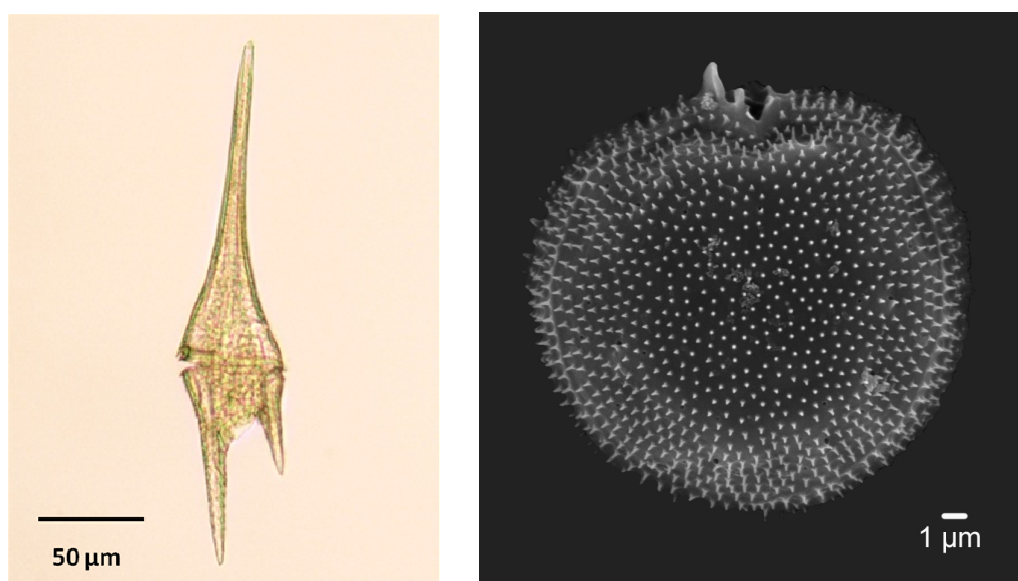


Figure VIII. 3. À gauche, *Ceratium furca* en microscopie photonique. À droite, *Prorocentrum minimum* en MEB (plate-forme de Microscopie Électronique du MNHN, Couté A. et Perrette C.).

La composition pigmentaire des Dinophyceae dépend de la nature autotrophe ou hétérotrophe des espèces considérées. Ainsi, les Dinophyceae autotrophes ont pour marqueur spécifique pigmentaire la péricidine (Kleppel & Pieper, 1984 ; Nelson, 1989), alors que les formes hétérotrophes qui ne possèdent pas ce pigment, présentent des teneurs importantes en 19'-hexanoyloxyfucoxanthine, en 19'-butanoyloxyfucoxanthine et en fucoxanthine (Kleppel *et al.*, 1988 ; Wright *et al.*, 1991 ; Millie *et al.*, 1993 ; Vera, 2005). Il apparaît donc primordial d'améliorer la connaissance des pigments caractéristiques des souches isolées en laboratoire et d'avoir une bonne connaissance des espèces présentes dans le milieu étudié.

La variabilité des assemblages phytoplanctoniques a été expliquée par la disponibilité en nutriments, par la variation de la lumière et des conditions de mélange. La distribution des espèces au sein de ces assemblages est dépendante du degré de stabilité et des concentrations en nutriments. Nous avons observé principalement une répartition des (i) espèces dites de stratégie R dans des conditions riches en sels nutritifs et soumises au mélange comme en hiver, (ii) les espèces de stratégie C dans des conditions riches en sels nutritifs et stables comme souvent au printemps et (iii) les espèces de stratégie S dans des conditions pauvres en sels nutritifs et stables comme en été (Figure VIII.4).

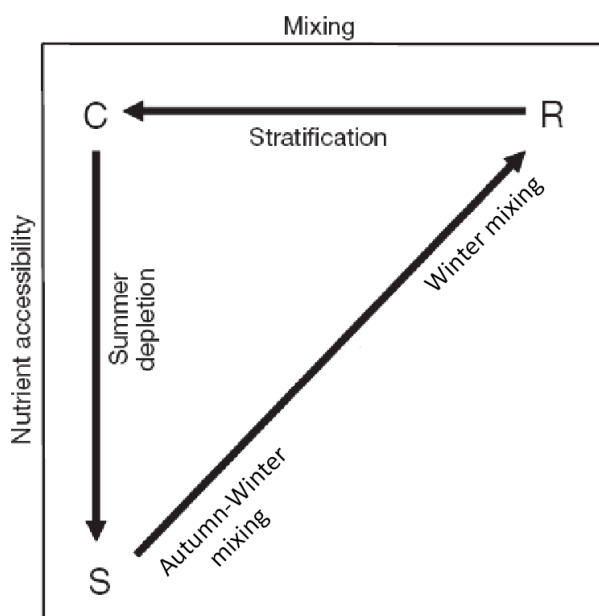


Figure VIII. 4. Schéma de succession saisonnière des stratégies de vie phytoplanctonique selon les composantes C-S-R en relation avec la disponibilité des sels nutritifs et le degré de mélange de la colonne d'eau (d'après Smayda & Reynolds, 2001).

Nos résultats sont en accord avec les travaux menés par Smayda & Reynolds (2001) et Guiselin (2010) qui ont établi la succession saisonnière des assemblages rencontrés en zones côtières. Ces auteurs ont proposé une approche similaire à celle formulée par Margalef (1978) dans laquelle la combinaison de la disponibilité en sels nutritifs et le degré de mélange déterminent la structure des assemblages. Toutefois, ce modèle inclut plusieurs modifications : il considère deux axes, la turbulence et les nutriments comme étant des variables indépendantes. Cependant à l'échelle de la période printanière, les assemblages apparaissent principalement sous la forme d'associations hétérogènes en termes de traits morphologiques. D'après Pannard *et al.* (2008), les événements de mélanges et les mouvements advectifs de l'eau influencent les fluctuations de la biomasse du phytoplancton total et la concentration des espèces dominantes, tandis que les processus locaux influencent les changements de structure de la communauté. Ils révèlent qu'à court terme des variations environnementales interviennent de manière répétée au cours de la saison, entraînant des changements dans la structure des communautés (Pannard *et al.*, 2008).

Pour conclure, nos résultats ont permis de mieux comprendre la dynamique des communautés phytoplanctoniques au cours des différentes successions saisonnières sur les deux sites présentant des spécificités locales propres. Nous avons également démontré que des événements météorologiques ayant lieu à courte échelle de temps pouvaient influencer les variations observées à plus grande échelle, agissant directement sur l'abondance des espèces ou indirectement sur les conditions en sels nutritifs et en lumière. Il serait intéressant de mener une étude avec une fréquence d'observation plus fine. En effet, la fréquence d'échantillonnage est cruciale pour suivre la dynamique du phytoplancton (Dubelaar *et al.*, 2004). Les variations à court terme s'échelonnent d'une échelle horaire à plusieurs jours et ne sont pas observables lorsque l'échantillonnage est hebdomadaire ou mensuel (Figure VIII.5).

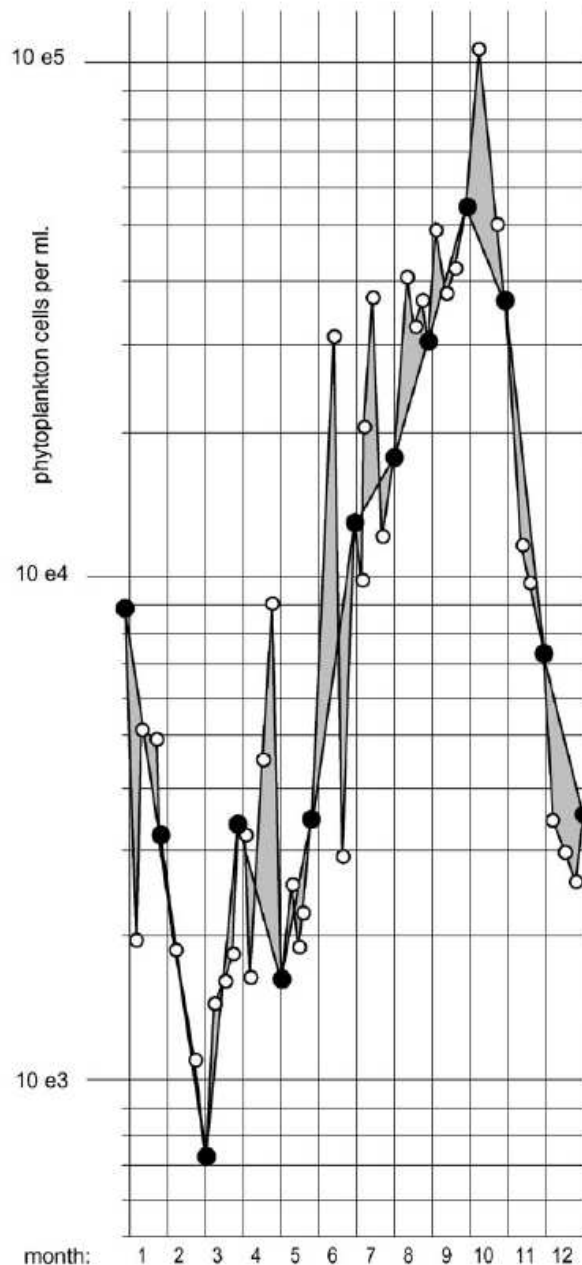


Figure VIII.5. Comptages phytoplanctoniques réalisés par un cytomètre en flux, illustrant la perte d'informations (aires grises) causée par la réduction d'un échantillonnage mensuel (ronds noirs) par rapport à un échantillonnage hebdomadaire (ronds blancs ; Dubelaar *et al.*, 2004).

VIII.2.2. Vers une meilleure compréhension de la diversité taxonomique et fonctionnelle de la lagune de Biguglia

Les lagunes côtières présentent une large diversité géomorphologique, hydrologique et biologique (Nixon, 1982). Ces écosystèmes sont très productifs dans les zones tempérées et sont par conséquent des systèmes préférentiels pour le développement des activités telles que la pisciculture et/ou l'ostréiculture. Cependant, de par leur position géographique les lagunes peuvent être soumises à des apports importants d'effluents domestiques ou

agricoles liés à une forte anthropisation du bassin versant (Kjerfve, 1994). L'impact de l'eutrophisation sur le fonctionnement écologique des milieux lagunaires dépend principalement de la quantité en sels nutritifs apportée par le bassin versant de la lagune (Frisoni, 1987). Les menaces liées à la pression anthropique peuvent entraîner des altérations de la biodiversité, de la structure et de l'organisation des assemblages aquatiques (Worm *et al.*, 2006). Les producteurs primaires jouent un rôle important dans le flux de matière et d'énergie vers les réseaux trophiques et soutiennent ainsi des services écosystémiques à haute valeur économique (e.g. pêche, ressources aquacoles). Les communautés phytoplanctoniques sont très sensibles aux variations des teneurs en éléments nutritifs, mais aussi aux variations de lumière, de température et de salinité. Les proliférations phytoplanctoniques étant étroitement liées aux apports d'azote et de phosphore, la concentration en Chl *a* est souvent utilisée comme indicateur du niveau d'eutrophisation des écosystèmes aquatiques (Smith *et al.*, 1999 ; Bricker *et al.*, 2003 ; Brito *et al.*, 2012).

Parallèlement aux mesures de Chl *a* dans la lagune de Biguglia, nous nous sommes attachés à étudier la dynamique spatio-temporelle et l'analyse fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques à l'échelle de la lagune, ainsi qu'à l'identification des facteurs abiotiques et biotiques qui les contrôlent. La lagune de Biguglia reçoit de son bassin versant des apports importants d'azote et de phosphore, liés essentiellement aux rejets des stations d'épurations et aux activités agricoles (Orsoni *et al.*, 2001). Les quantités en nutriments ont été accentuées par le démaquisage important ayant eu lieu dans les années 80, notamment pour les plantations de vignes, ce qui a amplifié le phénomène de lessivage des sols et les apports d'engrais. Ces apports anthropiques, combinés au faible renouvellement des eaux (environ 2 mois) et au fort ensoleillement, rendent la lagune de Biguglia particulièrement sensible à l'eutrophisation. Afin d'améliorer le confinement de cette lagune (lié à sa forme et à ses flux hydrologiques) et de restaurer son état écologique, des efforts de gestion ont été mis en œuvre concernant les flux hydrologiques fin 2009.

La lagune de Biguglia constitue un écosystème particulier, les échanges avec la mer et la circulation de l'eau sont contrôlés par le vent et la pression atmosphérique. Sa faible profondeur entraîne un brassage permanent de la colonne d'eau (Vaulot & Frisoni, 1986).

Jarry *et al.* (1990) décrivent les lagunes méditerranéennes comme des « écosystèmes à Diatomophyceae ». En effet, le brassage permanent de la colonne d'eau et les apports continus en nutriments peuvent favoriser la croissance des Diatomophyceae et la remise en suspension de genres benthiques tels que : *Achnanthes*, *Amphora*, *Diploneis*, *Grammatophora*, *Navicula* ou encore *Striatella* (Ricard, 1987 ; Tomas, 1997). Ces genres ont été décrits comme caractéristiques des lagunes méditerranéennes (Jarry *et al.*, 1991 ; Le Bec *et al.*, 1997). Nous les avons tous rencontrés dans la lagune de Biguglia en 2010 et notamment au niveau de la station S1. La production primaire, pour cette station (S1), a été soutenue par des apports externes d'azote, essentiellement sous forme de nitrate et a été dominée par le microphytoplancton, principalement des Diatomophyceae dont la croissance n'a pas été limitée durant la première période (Janvier à Mai). Ces résultats sont en accord avec la littérature (Chisholm, 1992 ; Agawin *et al.*, 2000). Ferrier & Rassoulzadegan (1991) et Selmer *et al.* (1993) ont prouvé que les apports d'azote, essentiellement sous forme de nitrate, favorisaient la croissance du microphytoplancton. Cependant les Diatomophyceae n'ont jamais été prédominantes sur l'ensemble de la lagune à l'instar du picophytoplancton en période estivale et des Dinophyceae en automne. Chisholm (1992) a démontré que les différences de distribution entre le micro-, le nano- et le picophytoplancton peuvent s'expliquer par leur taille respective qui leur confère des capacités spécifiques pour l'acquisition des nutriments et par l'utilisation des ressources azotées différentes. Quand les apports en nutriments sont faibles et que la production primaire est maintenue par l'azote régénéré (ammonium recyclé par les bactéries et le zooplancton), la petite taille des cellules picoplanctoniques leur confère un avantage compétitif dans l'acquisition et l'utilisation de ces nutriments (leurs besoins sont moindres ; Raven, 1998). L'importance de l'influence simultanée des apports marins et continentaux sur la structure des communautés phytoplanctoniques en milieu lagunaire explique la coexistence d'espèces d'eau douce et d'espèces marines, notamment à la station S1 située près de l'embouchure du grau et de la rivière le Bevinco. Toutefois, ces apports marins demeurent principalement dans le nord de la lagune. En effet, nous avons pu constater que le renouvellement des eaux pour les stations S2 et S3 se faisait plus lentement et principalement par diffusion.

Après le curage du canal du Fossone (fin 2009), les apports d'eau douce ont été augmentés lorsque les conditions météorologiques (pluie et vent) ont été favorables et ont

ainsi constitué une barrière à la pénétration de l'eau d'origine marine dans la lagune. En dépit de son impact positif sur l'oxygénation de l'eau et sur l'amélioration spontanée de la qualité de l'environnement notamment en période estivale (floraison de Cyanophyceae limitée), le curage du canal a été un facteur de confinement. Ces conditions ont favorisé le développement de certaines espèces comme *Prorocentrum minimum* durant la période automnale (Figure VIII.6).

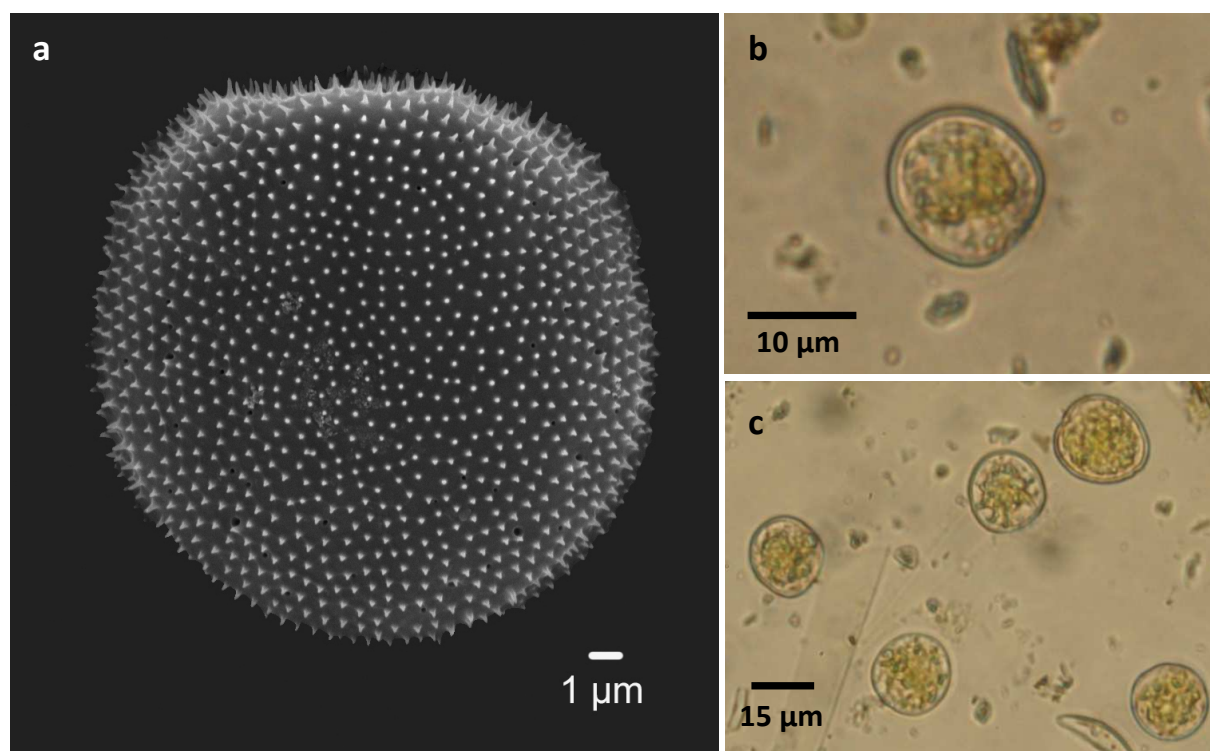


Figure VIII.6. Photographies au MEB (a ; plate-forme de Microscopie Électronique du MNHN, Couté A. et Perrette C.) et en microscopie photonique (b et c) de l'espèce de *Prorocentrum minimum* présente dans la lagune de Biguglia. Mise en évidence des morphotypes de l'espèce.

La croissance « explosive » de *Prorocentrum minimum* a été rendue possible grâce à un ensemble de facteurs intrinsèques à l'espèce mais dépendant des processus de contrôles externes. En effet, ce Dinophyceae mixotrophe, possède un taux de croissance élevé et peut avoir une action négative sur le développement et la physiologie de ses prédateurs ou d'espèces concurrentes, ce qui lui donne un avantage compétitif par rapport aux autres organismes (Heil *et al.*, 2005). Les mesures effectuées à l'aide du Phyto-PAM ont permis de mettre en évidence ce changement de régime alimentaire. Une efficacité potentielle maximale théorique élevée, caractérisé par Fv/Fm, ou un bon état physiologique de la population de *Prorocentrum minimum*, a été enregistré sur la lagune notamment durant la

période automnale ($> 0,5$). *A contrario*, la capacité photosynthétique effective (Φ_{PSII}) de la population a diminué spectaculairement au cours de la deuxième période (Juillet à Décembre). Collos *et al.* (2005) ont démontré que l'ammonium stimulait l'activité des β -carboxylases (voie anaplérotique qui peut être assimilée à de l'hétérotrophie). Ces remarques ont permis d'expliquer la diminution du proxy Φ_{PSII} dans la lagune durant la période automnale.

Tous ces résultats (chapitre VI) ont suggéré une restauration relative de la qualité de la lagune de Biguglia, cependant, l'eutrophisation reste préoccupante. En effet, l'enrichissement par le bassin versant et les stations de pompage, avec une augmentation de la présence d'espèces opportunistes, sont des signes caractéristiques de la sensibilité de la lagune face à l'eutrophisation. Outre les effets de la gestion des flux hydrologiques sur la structure et l'efficacité photosynthétique des communautés phytoplanctoniques mis en évidence dans notre étude (chapitre VI), nous avons pu noter que la dessalure a également eu un impact sur la structuration biologique de l'écosystème, notamment par le développement important de la magnoliophyte aquatique, *Najas major*, principalement dans le bassin du Sud en 2010 (35% de la superficie total du bassin Sud). Cette magnoliophyte n'avait encore jamais été observée dans cette lagune (Pasqualini *et al.*, 2006 ; Etourneau, *Comm. Pers.*).

La modification des flux hydrologiques, le vent et les actions de gestion (e.g. dragage) peuvent entraîner une remise en suspension des particules sédimentaires, notamment dans les milieux lagunaires peu profonds. Nous savons que dans le milieu aquatique, une grande partie des composés d'origine anthropique ou naturelle, s'adsorbe sur les particules en suspension, puis s'accumule au niveau des sédiments. C'est ainsi que les dépôts sédimentaires à l'interface des zones océaniques et continentales (e.g. les lagunes), constituent de véritables filtres et réservoirs pour les contaminants connus ou non et peuvent former d'importantes sources de contamination. Les analyses chimiques permettent de déterminer et de connaître le niveau de contamination d'un sédiment, mais donnent peu d'informations sur sa «qualité biologique». Pour mieux appréhender cette dernière ainsi que le rôle des stocks sédimentaires dans la restauration des milieux

lagunaires, il nous est apparu plus judicieux d'utiliser des bioessais sur des communautés phytoplanctoniques lagunaires naturelles, ceci à travers la mise en place de microcosmes *in situ*. Depuis 40 ans, les écotoxicologues développent des approches de plus en plus complexes et intégratives, afin de pallier aux inconvénients des tests monospécifiques. En effet, ces tests sont difficilement utilisables pour évaluer l'impact de produits chimiques à des niveaux d'organisation biologique supérieurs comme l'écosystème (Kimball & Levin, 1985 ; Cairns & Pratt, 1989; Pontasch *et al.*, 1989; Cairns *et al.*, 1992; Forbes & Forbes, 1994; Taub, 1997 ; Sanchez & Tarazona, 2002). Les systèmes expérimentaux mis en place, de taille et complexité variables, ont pour objectif de fournir une description plus réaliste du devenir et des impacts des contaminants et des nutriments au niveau d'écosystèmes simplifiés ou miniaturisés. Les microcosmes, dans lesquels une ou plusieurs variables peuvent être contrôlées, s'avèrent très utiles pour des évaluations à caractère prédictif (Solomon & Sibley, 2002). Giddings et Eddlemon (1979) décrivent les microcosmes comme des unités expérimentales uniques pour évaluer le comportement de contaminants au niveau écologique, permettant de combler les lacunes entre les tests d'écotoxicité normalisés et les études de terrain. De plus, ces systèmes préservent la complexité écologique et la stabilité caractéristique des environnements naturels. Une grande variété de systèmes a été décrite dans la littérature scientifique. Durant nos travaux de recherches (Chapitre VII), nous nous sommes focalisés principalement sur un système d'étude en microcosmes *in situ* incluant le compartiment phytoplanctonique, exposé à des xénobiotiques provenant d'élutriat de la lagune anthropisée de Biguglia. Cette étude réalisée sur des communautés naturelles, nous a permis de balayer un plus large spectre d'espèces, et donc de sensibilités face à une toxicité potentielle des sédiments. De plus, nous nous sommes rapprochés de cas réels observés dans les environnements peu profonds que sont les lagunes méditerranéennes. Nous nous sommes intéressés à l'impact de la remise en suspension des sédiments d'une lagune eutrophisée, soit par des actions physiques climatiques (e.g. vent, courant) soit par des actions anthropiques (e.g. dragage à des fins de gestion), sur la dynamique et la fonction des communautés phytoplanctoniques naturelles. Les résultats ont permis de mettre en évidence une accoutumance de certaines espèces ou populations non polluosensibles. De plus, ces populations ont formé des efflorescences dues à la présence dans les élutriats de nutriments et d'oligo-éléments essentiels (e.g. Fer, Zinc).

Nous savions que les prélèvements, le stockage et la manipulation des sédiments pouvaient modifier la biodisponibilité des contaminants et par conséquent leur toxicité. Mais nous savions aussi que la granulométrie des sédiments fixe différemment certains types de polluants (e.g. dans les sédiments plus grossiers la concentration en micro-polluants métalliques est plus faible). Nous avons pris également en compte le possible enrichissement de nos échantillons, dû aux apports sédimentaires. Malgré tout, lors de notre expérimentation nous avons été confrontés à un problème récurrent, mis en évidence par Caquet *et al.* (2001) lors de l'utilisation des microcosmes ou mésocosmes. Il s'agit de la variabilité des données obtenues lors des bioessais, nuisant au pouvoir de détection et à la sensibilité des critères d'effet pris en compte. De plus, les résultats de ces études ne peuvent être utilisés qu'au cas par cas, et leur interprétation repose sur ce que l'on appelle le « jugement d'expert », aucune ligne directrice n'existant pour ce type de tests (Stachowski-Haberkorn, 2008). De nombreuses années seront encore nécessaires pour l'ébauche d'une standardisation des études en microcosmes et/ou mésocosmes, notamment dans la détermination des concentrations prédites sans effet (PNEC ou *Predictive No Effect Concentration*), en dessous desquelles la substance considérée n'est pas censée provoquer de dommages à l'environnement (Annexe I du règlement REACH « enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques »). Les microcosmes, *outdoor* comme *indoor* (voir Stachowski-Haberkorn, 2008) ne sont pas des écosystèmes en miniature, mais des fragments d'écosystèmes conçus pour simuler des caractéristiques sélectionnées (Cairns & Buikema, 1984). Le fait de contrôler la structure influence la réponse, qui est sensible à la structure (Crow & Taub, 1979).

Pour conclure, l'amélioration de la qualité de l'eau est un enjeu majeur pour l'avenir de la lagune de Biguglia. Cependant, la restauration des lagunes ne peut se faire qu'à la condition de (i) veiller sur la qualité de l'eau douce qui alimente l'écosystème, (ii) le bon fonctionnement des réseaux d'assainissement, (iii) le rôle des stocks sédimentaires dans le retard possible de restauration de ces milieux peu profonds et (iv) une gestion d'ouverture et de fermeture adéquate du grau naturel, seule possibilité de dispersion des nutriments.

VIII.3. Apports scientifiques à la gestion

Dans les contextes démographique, économique et écologique actuels (e.g. explosion démographique, urbanisation grandissante, surexploitation des ressources naturelles, réchauffement climatique), la protection des espaces et des espèces et la conservation des ressources naturelles ne sont plus suffisantes pour assurer les biens et services nécessaires à l'Homme (Clewett & Aronson, 2010). En effet, des modifications importantes des équilibres écologiques ont été observées à l'échelle mondiale, pouvant, dans certains cas, menacer la pérennité du milieu lui-même. Les pressions anthropiques, tant par l'augmentation des populations que par leurs usages, entraînent une exploitation accrue et non durable des services écosystémiques, provoquant l'érosion de la biodiversité ainsi que la dégradation des écosystèmes. La restauration écologique des écosystèmes dégradés est donc devenue une priorité. La « Society for Ecological Restoration International » (SERI, 2004) définit la restauration écologique comme « *le processus d'assister l'auto-régénération des écosystèmes qui ont été dégradés, endommagés ou détruits* ». La restauration nécessite une meilleure connaissance de l'écologie fonctionnelle et évolutive des écosystèmes ciblés. Il a été observé que la restauration des milieux implique des processus différents et généralement plus longs que les mécanismes rapides de dégradation. Cette hystérésis s'explique en partie par le fait que face à des changements environnementaux graduels, les écosystèmes basculent vers des états stables alternatifs (Scheffer & Van Nes, 2007).

Au sein des écosystèmes côtiers, les lagunes sont parmi les systèmes les plus dynamiques et les plus productifs (Nixon, 1982 ; Caumette *et al.*, 1996). Toutefois, elles font également parties des zones les plus menacées par l'eutrophisation du fait de leur faible profondeur et de leur relatif confinement (Howarth *et al.*, 1996 ; Cloern, 2001 ; Newton & Mudge, 2005). De plus, en raison d'un essor démographique continu sur le littoral, les lagunes possèdent souvent des bassins versants fortement urbanisés qui tendent à apporter un excès de nutriments qui peut être à l'origine de crises dystrophiques (Caumette *et al.*, 1996). Le caractère temporaire ou permanent des échanges hydriques avec le milieu marin à travers le grau (ou passe), influencés par les vents et l'amplitude des marées, confère aux eaux lagunaires, outre une salinité variable, un temps de renouvellement plus ou moins long. En effet, dans les lagunes où l'impact des marées est faible, les courants générés par le vent

deviennent les principaux agents de mélange et de renouvellement des eaux (Dronkers & Zimmerman, 1982). La réponse des lagunes à ces fluctuations et aux modifications des conditions environnementales a influencé le développement et l'importance relative des producteurs primaires (phanérogames, macroalgues, phytoplancton). A l'échelle des communautés, le phytoplancton est le compartiment répondant le plus rapidement aux variations des paramètres environnementaux et donc au processus de restauration. La réduction et/ou l'augmentation drastique des apports nutritifs conduit à l'exacerbation de la compétition au sein des communautés phytoplanctoniques pour acquérir et exploiter les ressources nutritives disponibles. De plus le maintien et la croissance du phytoplancton est régit par les variations environnementales, en particulier la salinité. Par conséquent, l'évolution de la structuration des communautés phytoplanctoniques (diversités taxonomique et fonctionnelle) lors du processus de restauration constitue une réponse adaptative des différents groupes algaux. De par la position du phytoplancton dans les réseaux trophiques aquatiques et du fait de sa grande sensibilité face aux variations des conditions environnementales, nous avons étudié le compartiment phytoplanctonique. Sur la base de ces constatations, la « *Water Framework Directive* » a retenu un indicateur « Phytoplancton » pour contribuer à caractériser l'état écologique des masses d'eau. Un indicateur est un outil d'évaluation et d'aide à la décision, grâce auquel nous pouvons mesurer une situation ou une tendance spatio-temporelle, de façon relativement objective. L'indicateur (qualitatif ou/et quantitatif) décrit généralement un état, une pression, une réponse ne pouvant être appréhendés directement. L'indicateur « Phytoplancton » est composé de trois paramètres : la biomasse, l'abondance et la composition (Soudant & Belin 2010). Il doit, de plus, intégrer les différences marquées et les fortes spécificités régionales (Foden *et al.*, 2010), qui s'expriment en termes de diversité, d'abondance relative des espèces, de classes de taille et de successions saisonnières. L'indicateur doit résumer des informations complexes offrant la possibilité à des acteurs différents (scientifiques, gestionnaires, décideurs) de dialoguer entre eux. Cette synthèse implique une connaissance approfondie du fonctionnement des zones étudiées et de ses caractéristiques. Disposer de suivis réguliers et d'indicateurs associés permet à la gestion d'être adaptative. En effet, les suivis doivent mesurer des variables qui peuvent guider les actions de gestion quand ces derniers sont mises en relation avec leurs objectifs (Gerber *et al.*, 2005). Ward (2000) et Stem *et al.* (2005) ont prouvé qu'une telle gestion était avantageuse par rapport aux

systèmes de gestion traditionnels. En effet, elle permet de rentabiliser les ressources allouées aux suivis (Gerber *et al.*, 2005) et de rendre plus pertinente la mise en relation des mesures réalisées lors des suivis avec les objectifs de gestion (Green *et al.*, 2005). La prise en compte des considérations écologiques pour la préservation des écosystèmes côtiers apparaît donc, au regard des études menées dans cette thèse, comme essentielle. Toutefois ces milieux sont rarement dédiés à la seule conservation du patrimoine naturel. Ils sont généralement le siège d'une exploitation des ressources vivantes ou d'activités récréatives. Leur préservation repose, par conséquent, sur des pratiques de gestion engendrant une dimension économique ou de développement durable (UNESCO, 2001). Cette approche est primordiale pour toute tentative de gestion et de restauration.

Les gestionnaires de la Réserve Naturelle de l'Étang de Biguglia (RNEB) sont confrontés directement à la mise en œuvre d'actions visant à concilier le bon fonctionnement de l'environnement (e.g. préservation, entretien), le maintien de l'activité économique (e.g. pêche) et la restauration du milieu (e.g. curage du canal du Fossone en 2009, Figure VIII.7). De par sa situation géographique, l'amélioration de la qualité des eaux, élément indispensable à la conservation et au maintien de la biodiversité et préoccupation constante des gestionnaires, se heurte à de nombreuses difficultés. En effet, la lagune de Biguglia souffre encore de nombreuses pollutions notamment d'origine domestique (Mouillot *et al.*, 2000 ; Orsoni *et al.*, 2001). Dans le cadre de la gestion de la RNEB, le Conseil Général de la Haute-Corse (CG2B) a élaboré en 2003 son deuxième plan de gestion. Ce document qui couvre la période 2004-2009 a été évalué. Ce travail d'évaluation a permis de dresser un bilan du travail accompli durant ces cinq années et de dégager les orientations du prochain plan de gestion. C'est dans le cadre de cette évaluation que nous avons apporté nos connaissances scientifiques, afin d'étudier l'impact des actions de gestions sur la structure et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques et fournir un diagnostic de l'état de la lagune. Dans les milieux lagunaires, les apports nutritifs continus, provenant essentiellement des rejets d'effluents urbains (ruissellement urbain et rejets de stations d'épuration ; Souchu *et al.*, 2010), sont immédiatement absorbés et jouent un rôle essentiel dans les niveaux de biomasse observés et dans la structuration des communautés phytoplanctoniques en termes de classe de taille (Frisoni, 1987 ; Bec *et al.*, 2011a, Dubroca, 2011). Parallèlement, les processus de dégradation du phytoplancton et des macroalgues

opportunistes amplifient l'altération du compartiment sédimentaire en l'enrichissant de manière excessive en matière organique, en azote et en phosphore total (Ifremer, 2011). La lagune de Biguglia a ainsi stocké d'importantes quantités d'azote et de phosphore dans ses sédiments lors de la phase d'eutrophisation. D'autre part, les stocks sédimentaires d'azote et phosphore, qui engendrent des flux de nutriments, du sédiment vers la colonne d'eau, jouent un rôle essentiel. Ce relargage sédimentaire (ou charge interne) remet des sels nutritifs et contaminants à disposition des autres compartiments de l'écosystème (e.g. colonne d'eau, macroalgues) et ralentit ainsi les effets des mesures de gestion visant à réduire les charges externes (e.g. apports du bassin versant). La dynamique de ces stocks sédimentaires est relativement complexe et dépend de processus de stockage et déstockage (Souchu *et al.*, 1998; 2001; Thouzeau *et al.*, 2007).



Figure VIII.7. Canal du Fossone avant le curage à gauche et curage du canal en fin d'année 2009 à l'aide d'une pelle mécanique à droite (Source : Conseil Général de la Haute-Corse, RNEB).

Les données acquises durant cette thèse ont permis l'enrichissement des connaissances nécessaires à l'établissement de l'indice « phytoplancton », en y intégrant deux séries de données provenant de deux écosystèmes côtiers ayant des spécificités locales, mais également d'apporter la validation d'outils de surveillance tels que : la FluoroProbe®. Les espèces ou populations constituant des indicateurs peuvent être suivis de manière ciblée. Ceci est un atout pour les structures de gestion car les ressources en temps et en expérience, et donc en coûts, sont moindres que lors de suivis exhaustifs des assemblages. D'autres techniques simplifiées de suivi devraient et peuvent aussi être plus largement développées pour l'étude des présences/absences de certains groupes taxonomiques de micro-algues, mais également pour le suivi des concentrations en Chl α .

Cependant les techniques d'analyses appropriées à ce genre de données ne permettent que difficilement de mettre en évidence des effets liés à l'impact des actions de gestions et les présences ou absences de micro-algues ne peuvent renseigner sur l'intensité d'un effet. Les suivis simplifiés peuvent être réalisés plus régulièrement mais ne doivent remplacer en aucun cas des suivis exhaustifs des assemblages par microscopie, qui eux seuls peuvent rendre compte d'effets inattendus des mesures de gestion. De plus, dans le cadre de cette thèse, l'utilisation de la microscopie nous a permis d'observer des groupes taxonomiques profitables, ou non, au réseau trophique supérieur, comme *Anabaena*, *Chaetoceros*, *Ceratium furca*, *Dinophysis*, *Pseudo-Nitzschia*, *Prorocentrum minimum*, *Skeletonema costatum* et de caractériser ainsi l'état de santé des milieux étudiés. Conscient des enjeux que peuvent représenter les relations proie/prédateur, nous travaillons actuellement avec l'Université de Bordeaux, sur l'étude de l'identification des communautés zooplanctoniques et leurs variations en fonction des communautés phytoplanctoniques en présence, ceci, dans le but de mieux cerner l'impact de l'état de confinement ou d'eutrophisation de la lagune de Biguglia le long de la chaîne trophique. En effet, la lagune de Biguglia est un milieu riche possédant une grande biodiversité, mais nous avons pu mettre en évidence que selon son confinement et l'eutrophisation du milieu, des efflorescences d'espèces toxiques ou non profitables aux ressources halieutiques pouvaient avoir lieu. Le travail effectué à la RNEB en étroite collaboration avec les gestionnaires a été une expérience positive. Cette coopération nous a offert des résultats intéressants comme l'enrichissement des connaissances scientifiques sur le fonctionnement biologique du phytoplancton, mais également des informations précieuses ayant permis de mettre en avant qu'une gestion partielle des flux hydrologiques (par le curage du canal du Fossone ; Figure VIII.7) peut considérablement modifier la structure et l'efficacité photosynthétique des communautés phytoplanctoniques comme l'écosystème lagunaire dans son ensemble. L'objectif de ces travaux a été d'améliorer la cohérence des actions de gestion et de progresser par un enrichissement des retours d'expériences en capitalisant les apports scientifiques. Le partenariat est un concept d'importance si l'on considère que les universités, les organismes de conservation et le secteur privé peuvent offrir une aide précieuse dans l'établissement de projets de recherche, de surveillance et d'analyse des interactions entre systèmes sociaux et systèmes écologiques dans une perspective de durabilité écologique, économique et sociale.

Cette thèse aura permis de renforcer les connaissances scientifiques fondamentales sur la dynamique et le fonctionnement des communautés phytoplanctoniques dans certains écosystèmes côtiers en Corse, mais également de mettre en exergue les axes de recherche à développer. En effet, bien que le phytoplancton semble répondre rapidement à la diminution des apports nutritifs, la structuration de ce compartiment d'un point de vue fonctionnel, lors du processus de restauration des milieux lagunaires, reste encore méconnue. Dans les lagunes où des mesures de gestion ont été prises pour réduire les apports en nutriments, la structuration des communautés phytoplanctoniques, en termes de diversité taxonomique et fonctionnelle, dépendra des capacités intrinsèques des espèces à acquérir et exploiter les nutriments disponibles (Collos *et al.*, 2009). Dans ces conditions, les différents groupes phytoplanctoniques adoptent des stratégies écologiques contrastées (Margalef, 1978 ; Sommer, 1984 ; Collos, 1986) associées à leurs traits biologiques (taille, croissance, cinétique nutritive). Ces stratégies adaptatives associées aux groupes fonctionnels permettent d'augmenter les capacités de résilience des communautés face aux changements de l'écosystème (Elliott *et al.*, 2007).

Une étude plus approfondie sur la gestion du grau naturel de la lagune de Biguglia serait nécessaire afin de mieux appréhender les conséquences des échanges mer/lagune sur la qualité de l'eau (confinement et eutrophisation), les communautés phytoplanctoniques (structuration biologique) et *in fine* les ressources halieutiques. Les flux hydrologiques au niveau de la lagune pourraient être mis en relation avec la modélisation de la courantologie, dans le but de mieux appréhender les principaux facteurs abiotiques qui pourraient influencer le développement des communautés phytoplanctoniques et espèces émergentes potentiellement toxiques. Pour cela des expérimentations en mésocosmes *in situ* ou en microcosme en laboratoire pourraient être envisagées avec des cultures monospécifiques ou/et communautés phytoplanctoniques. Ces apports scientifiques permettront *in fine* de fournir une aide à la gestion, notamment dans la prise de décision qui incombe aux gestionnaires, dans une optique de gestion des milieux. Au niveau international, la restauration des écosystèmes marins côtiers, notamment celle des écosystèmes lagunaires, a été très peu abordée et cet axe de gestion et de recherche reste à développer. Des premières observations et réflexions théoriques mettent en doute le fait que les systèmes côtiers ayant subi de fortes perturbations sur plusieurs dizaines d'années puissent retourner

vers leur état d'origine historique et mettent en évidence un manque cruel de données décrivant des trajectoires de retour vers cet état d'origine lors du processus de restauration (Elliott *et al.*, 2007 ; Duarte *et al.*, 2009).

CHAPITRE IX

Bibliographie



- Abrantes N., Antunes S.C., Pereira M.J., Gonçalves F., 2006.** Seasonal succession of cladocerans and phytoplankton and their interactions in a shallow eutrophic lake (Lake Vela, Portugal). *Acta Oecologica* 29: 54-64.
- Accornero A., Gnerre R., Manfra L., 2008.** Sediment concentrations of trace metals in the Berre lagoon (France): an assessment of contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 372-385.
- AFNOR, 2006.** Norme guide pour le dénombrement du phytoplancton par microscopie inversée. Méthode Utermöhl. NF EN 15204: 39 p.
- Agawin N.S.R., Duarte C.M., Agusti S., 1998.** Growth and abundance of *Synechococcus* sp in a Mediterranean Bay: seasonality and relationship with temperature. *Marine Ecology Progress Series* 170: 45-53.
- Agawin N.S.R., Duarte C.M., Agusti S., 2000.** Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography* 45: 591-600.
- Agusti S., Duarte C.M., 2000.** Experimental induction of a large phytoplankton bloom in Antarctic coastal waters. *Marine Ecology Progress Series* 206: 73-85.
- Alcaraz M., Saiz E., Calbet A., 1994.** Small-scale turbulence and zooplankton metabolism: effects of turbulence on heartbeat rates of planktonic crustaceans. *Limnology and Oceanography* 39: 1465-1470.
- Allen J.F., 1992.** Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochimica and Biophysica Acta* 1098: 275-335.
- Alvarez-Cobelas M., Rojo C. Angeler D.G., 2005.** Mediterranean limnology: current status, gaps and the future. *Journal of Limnology* 64: 13–29.
- Amblard C., 1987.** Les successions phytoplanctoniques en milieu lacustre. *Annale Biologique* 26: 1-34.
- Aminot A., Kérouel R., 2004.** Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Editions Ifremer, Plouzané, France: 336 p.
- Andersen R.A., 1992.** Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation* 1: 267-292.
- Andersen V., Prieur L., 2000.** High Frequency time series observations in the open Northwestern Mediterranean Sea and effects of wind events (DYNAPROC study, May 1985). *Deep Sea Research Part I* 47 (3): 397-422.

- Andersen V., Nival P., Caparroy P., Gubanova A., 2001.** Zooplankton community during the transition from spring bloom to oligotrophy in the open NW Mediterranean and effects of wind events. 1. Abundance and specific composition. *Journal of Plankton Research* 23: 227-242.
- Anderson A., Haecky P., Hagstroem A., 1994.** Effect of temperature and light on the growth of micro- nano- and pico-plankton: impact on algal succession. *Marine Biology* 120: 511-520.
- Anderson D.M., Glibert P.M., Burkholder J.M., 2002.** Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25: 704-726.
- Antoine D., Morel A., André J., 1995.** Algal pigment distribution and primary production in the eastern Mediterranean as derived from Coastal Zone Color Scanner observations. *Journal of Geophysical Research* 100: 16193–16209.
- Armi Z., Trabelsi E., Turki S., Béjaoui B., Ben-Maïz N., 2010.** Seasonal phytoplankton responses to environmental factors in a shallow Mediterranean lagoon. *Journal of Marine Science and Technology* 15: 417-426.
- Aro E.M., Virgin I., Andersson B., 1993.** Photoinhibition of photosystem II: Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica and Biophysica Acta* 1143: 113-134.
- Ayadi H., Abid O., Elloumi J., Nouai A., Sime-Ngando T., 2004.** Structure of the phytoplankton communities in two lagoons of different salinity in the Sfax saltern (Tunisia). *Journal of Plankton Research* 26 (6): 669-679.
- Badosa A., Boix D., Brucet S., Lopez-Flores R., Quintana X.D., 2007.** Short-term effects of changes in water management on the limnological characteristics and zooplankton of a eutrophic Mediterranean coastal lagoon (NE Iberian Peninsula). *Marine Pollution Bulletin* 54: 1273–1284.
- Baker N.R., 2008.** Chlorophyll Fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113.
- Barbier E.B., Hacker S.D., Kennedy C., Koch E.W., Stier A.C., Silliman B.R., 2011.** The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs* 81: 169-193.
- Barica J., Mur L.R., 1980.** Hypertrophic Ecosystems. In: Development in *Hydrobiology* 2, Dr. W. Junk BV, The Hague: 347 p.

- Barlow R.G., Mantoura R.F.C., Cummings D.G., Fileman T.W., 1997.** Pigment chemotaxonomic distributions of phytoplankton during summer in the western Mediterranean. *Deep-Sea Research part II* 44: 833-850.
- Barnes R.S.K., 1980.** Coastal Lagoons. In: Cambridge Studies in Modern Biology 1. Cambridge University Press, Cambridge: 106 pp.
- Bartolomé M.C., D'ors A., Sanchez-Fortun S., 2009.** Toxic effects induced by salt stress on selected freshwater prokaryotic and eukaryotic microalgal species. *Ecotoxicology* 18: 174-179.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., 1998.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean sea. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 765-776.
- Bay D., 1978.** Etude *in situ* de la production primaire d'un herbier de posidonies, *Posidonia oceanica* (L. Delile), dans la Baie de Calvi, Corse. Thèse de Doctorat, Université de Liège: 251p.
- Bec B., 2005.** Dynamique du picophytoplancton dans les lagunes Méditerranéennes du Languedoc-Roussillon et de Corse. Thèse de doctorat, Université de Toulouse III: 238 p.
- Bec B., Husseini-Ratrema J., Collos Y., Souchu P., Vaquer A., 2005.** Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *Journal of Plankton Research* 27 (9): 881-894.
- Bec B., Collos Y., Souchu P., Vaquer A., Lautier J., Fiandrino A., Benau L., Orsoni V., Laugier T., 2011a.** Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquatic Microbial Ecology* 63, 29-45.
- Bec B., Malet N., Dubroca L., Munaron D., Vaquer A., Collos Y., 2011b.** Effects of sewage effluent diversion on nutrient and phytoplankton dynamics in French Mediterranean lagoons: results from a ten year survey. ICES Annual Science Conference, Gdansk, Pologne, 19-23 Septembre 2011.
- Behrenfeld M.J., Halsey K.H., Milligan A.J., 2008.** Evolved physiological responses of phytoplankton to their integrated growth environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 2687-2703.

- Behrenfeld M.J., Prasil O., Babin M., Bruyant F., 2004.** In search of a physiological basis for covariations in light-limited and light-saturated photosynthesis. *Journal of Phycology* 40: 4-25.
- Bel-Hassen M., Hamza A., Drira Z., Zouari A., Akrouf F., Messaoudi S., Aleya L., Ayadi H., 2009.** Phytoplankton-pigment signatures and their relationship to spring–summer stratification in the Gulf of Gabes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 83: 296-306.
- Ben Charrada R., 1992.** Le lac de Tunis après les aménagements: paramètres physico-chimiques de l'eau et relation avec la croissance des algues. *Marine Life* 1: 29-44.
- Bérard A., Leboulanger C., Pelte T., 1999a.** Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to Atrazine in Natural Phytoplankton Populations and in Pure Culture: Influence of Season and Temperature. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37: 472-479.
- Bérard A., Pelte T., Druart J.C., 1999b.** Seasonal variations in the sensitivity of Lake Geneva phytoplankton community structure to atrazine. *Archiv für Hydrobiologie* 145: 277-295.
- Bérard A., Benninghoff C., 2001.** Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere* 45: 427-437.
- Bérard A., Dorigo U., Humbert J.F., Leboulanger C., Seguin F., 2002.** La méthode PICT (Pollution-Induced Community Tolerance) appliquée aux communautés algales. Intérêt comme outil de diagnose et d'évaluation du risque écotoxicologique en milieu aquatique. *Annales de Limnologie* 38: 247–261.
- Bérard A., Dorigo U., Mercier I., Becker-van Slooten K., Grandjean D., Leboulanger C., 2003.** Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* 53: 935-944.
- Berland B.R., Bonin D.J., Maestrini S.Y., 1980.** Azote ou phosphore? Considérations sur le « paradoxe nutritionnel » de la mer Méditerranée. *Oceanology Acta* 3: 135-142.
- Bernardi-Aubry F., Berton A., Bastianini M., Socal G., Acri F., 2004.** Phytoplankton succession in a coastal area of the NW Adriatic, over a 10-year sampling period (1990-1999). *Continental Shelf Research* 24: 97-115.
- Béthoux J.P., 1979.** Budgets of the Mediterranean Sea. Their dependance on the local climate and on the characteristics of the Atlantic waters. *Oceanologica Acta* 2: 157-163.

- Béthoux J.P., Morin F., Madec C., Gentili B., 1992.** Phosphorous and nitrogen behaviour in the Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research* 34: 1641-1654.
- Béthoux J.P., Gentili B., 1996.** The Mediterranean Climatic Sea, coastal and deep-sea signatures of and environmental changes. *Journal of Marine Systems* 7: 383-394.
- Béthoux J.P., Gentili B., Morin P., Nicolas E., Pierre C., Ruiz-Pino D., 1999.** The Mediterranean Sea: a miniature ocean for climatic and environmental studies and a key for the climatic functioning of the North Atlantic. *Progress in Oceanography* 44: 131–146.
- Béthoux J.P., Morin P., Ruiz-Pino D.P., 2002.** Temporal trends in nutrient ratios: chemical evidence of Mediterranean ecosystem changes driven by human activity. *Deep-Sea Research Part II*. 49:2007-2016.
- Bettinetti A., Pyaert P., Sweerts J.P., 1996.** Application of an Integrated Management Approach to the Restoration Project of the Lagoon of Venice. *Journal of Environmental Management* 46: 207–227.
- Beutler M., Wiltshire K.H., Meyer B., Moldaenke C., Dau H., 2001.** *In situ* profiles of phytoplankton: algal composition and biomass determined fluorometrically. In: Ninth international conference on harmful algal blooms, Hobart (Australia), 7-11 February 2000 (ed. G. M. Hallegraeff, S. I. Blackburn, C. J. Bolch and R. J. Lewis), Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris: 202-205.
- Beutler M., Wiltshire K.H., Meyer B., Moldaenke C., Lüring C., Meyerhöfer M., Hansen U.P., Dau H., 2002.** A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynthesis Research* 72: 39-53.
- Beveridge M.C.N., Baird D.J., Rahmatullah S.M., Lawton L.A, Beattie K.A, Codd G.A., 1993.** Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oerochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 43: 901-907.
- Bird E.C.F., 1982.** Changes on barriers and spits enclosing coastal lagoons. Coastal lagoons Processes. *Oceanologica Acta*: 45-53.
- Bird E.C.F., 1994.** Physical setting and geomorphology of coastal lagoons. In Kjerfve B.(ed) Coastal Lagoon Processes. *Oceanography Series*: 9-36.
- Bjørnland T., Liaaen-Jensen S., 1989.** Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics. In: Green JC, Leadbeater BSC, Diver WL (eds) The chromophyte algae: problems and perspectives. Clarendon press, Oxford: 37-61.

- Blandin P., 1986.** Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'écologie* 17: 215-307.
- Boero F., Bouillon J., Gravili C., Miglietta M.P., Parsons T.R., Piraino S., 2008.** Gelatinous plankton: irregularities rule the world (sometimes). *Marine Ecology Progress Series* 356: 299-310.
- Bolhàr-Nordenkamp H.R., Long S.P., Baker N.R., Oquist G., Schreiber U., Lechner E.G., 1989.** Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3: 497-514.
- Boon P.I., Bunn S.E., Green J.D., Shiel R.J., 1994.** Consumption of cyanobacteria by freshwater zooplankton; implications for the success of « top down » control of cyanobacterial blooms in Australia. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research* 45: 875-887.
- Bowen J.L., Valiela I., 2001.** The ecological effects of urbanization of coastal watersheds: historical increases in nitrogen loads and eutrophication of Waquoit Bay estuaries. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 1489-1500.
- Brayner R., Couté A., Livage J., Perrette C., Sicard C., 2011.** Micro-algal biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401 : 581-597.
- Bricker S.B., Ferreira J.G., Simas T., 2003.** An integrated methodology for assessment of estuarine trophic status. *Ecological Model* 169: 39-60.
- Briggs J.C., 1994.** Species diversity: Land and Sea compared. *Systematic Biology* 43: 130-135.
- Brito A.C., Brotas V., Caetano M., Coutinho T.P., Bordalo A.A., Icely J., Neto J.M., Serodio J., Moita T., 2012.** Defining phytoplankton class boundaries in Portuguese transitional waters: An evaluation of the ecological quality according to the Water Framework Directive. *Ecological indicators* 19: 5-14.
- Brohée M., Goffart A., Frankignoulle M., Henri V., Mouchet A., Hecq J.H., 1989.** Variations printanières des communautés planctoniques en Baie de Calvi (Corse) en relation avec les contraintes physiques locales. *Cahiers de Biologie Marine* 30: 321-328.
- Bruno C., Dupré G., Giorgetti G., Giorgetti J.P., Alesandri, 2001.** Chi tempu face? météorologie, climat et microclimats de la Corse. CRDP de Corse/Météo France : 118 p.
- Büchel C., Wilhelm C., 1993.** *In vivo* analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems, and perspectives. *Photochemistry and Photobiology* 58: 137-148.

- Burton G.A., Johnston E.L., 2010.** Assessing contaminated sediments in the context of multiple stressors. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 2625-2643.
- Bustillos-Guzman J., Claustre H., Marty J.C., 1995.** Specific phytoplankton signatures and their relationship to hydrographic conditions in the coastal northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* 124, 247-258.
- Cairns J., Buikema A.L., 1984.** Verifying predictions of environmental safety and harm. Maryland Sea Grant Publication, University of Maryland, College Park. in H.H. White, ed., *Concepts in Marine Pollution Measurements*: 81-111.
- Cairns J., Pratt J.R., 1989.** The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia* 188/189: 5-20.
- Cairns J., McCormick P.V., Belanger S.E., 1992.** Ecotoxicological testing : small is reliable. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 11: 247-263.
- Calabrese E.J., 2005.** Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution* 138: 378-411.
- Calabrese E.J., 2008.** Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1451-1474.
- Calabrese E.J., Blain R., 2004.** Metals and hormesis. *Journal of Environmental Monitoring* 6: 14N-19N.
- Campbell D., Hurry A., Clarke A.K., Gustafsson P., Öquist G., 1998.** Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 667-683.
- Campbell L., Nolla H.A., Vaultot D., 1994.** The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central north Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* 39: 954-961.
- Caquet T., Lagadic L., Monod G., Lacaze J.C., Couté A., 2001.** Variability of Physicochemical and Biological Parameters between Replicated Outdoor Freshwater Lentic Mesocosms. *Ecotoxicology* 10: 51-66.
- Cardoso P.G., Pardal M.A., Lillebø A.I., Ferreira S.M., Raffaelli D., Marques J.C., 2004.** Dynamic changes in seagrass assemblages under eutrophication and implications for recovery. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 302: 233-248.
- Caric M., Jasprica N., Calic M., Batistic M., 2011.** Phytoplankton response to high salinity and nutrient limitation in the eastern Adriatic marine lakes. *Scientia Marina* 75(3): 493-505.

- Carrada G.C., Hopkins T.S., Bonaduce G., Ianora A., Marino D., Modigh M., Ribera d'Alcalà M., Scotto di Carlo B., 1980.** Variability in the hydrographic and biological features of the Gulf of Naples. *Marine Ecology* 1: 105-120.
- Catherine A., Escoffier N., Belhocine A., Nasri A.B., Hamlaoui S., Yéprémian C., Bernard C., Troussellier M., 2012.** On the use of the FluoroProbe®, a phytoplankton quantification method based on fluorescence excitation spectra for large-scale surveys of lakes and reservoirs. *Water Research* 46: 1771-1784.
- Caumette P., Castal J., Herbert R., 1996.** Coastal lagoon eutrophication and anaerobic processes (CLEAN). Nitrogen and sulfur cycles and population dynamics in coastal lagoons. *Hydrobiologia* 329: 225p.
- Chakraborty P., Babu P.V.R., Acharyya T., Bandyopadhyay D., 2010.** Stress and toxicity of biologically important transition metals (Co, Ni, Cu and Zn) on phytoplankton in a tropical freshwater system: An investigation with pigment analysis by HPLC. *Chemosphere* 80: 548-553.
- Chalifour A., Juneau P., 2012.** Temperature-dependent sensitivity of growth and photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and two strains of *Microcystis aeruginosa* to the herbicide atrazine. *Aquatic Toxicology* 103 (1–2): 9-17.
- Chapman P.M., 2002.** Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. *Science of the Total Environment* 288: 131-140.
- Charles F., Lantoine F., Brugel S., Chrétiennot-Dinet M.J., Quiroga I., Rivière B., 2005.** Seasonal survey of the phytoplankton biomass, composition and production in a littoral NW Mediterranean site, with special emphasis on the picoplanktonic contribution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65: 199-212.
- Chatzigeorgiou G., Reizopoulou S., Maidanou M., Naletaki M., Orneraki E., Apostolaki E., Arvanitidis C., 2011.** Macrobenthic community changes due to dystrophic events and freshwater inflow: Changes in space and time in a Mediterranean lagoon (Gialova lagoon, SW Greece). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 94: 111-121.
- Chisholm S.W., 1992.** Phytoplankton size. In Falkowski P.G., Woodhead A.D., (eds) Primary production and biogeochemical cycles in the sea. Plenum Press: 213-237.
- Chisholm S.W., Olson R.J., Zettler E.R., Goericke R., Waterbury J.B., Welschmeyer N.A., 1988.** A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* 334: 340-343.

- Chomérat N., Couté A., 2008.** *Protoperidinium bolmonense* sp nov. (Peridinales, Dinophyceae), a small dinoflagellate from a brackish hypereutrophic lagoon (South of France). *Phycologia* 47 (4): 392-403.
- Chomérat N., Garnier R., Bertrand C., Cazaubon A., 2007.** Seasonal succession of cyanoprokaryotes in a hypereutrophic oligo-mesohaline lagoon from the South of France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 72: 591-602.
- Chrétiennot-Dinet M.J., 1998.** Global increase of algal blooms, toxic events, casual species introductions and biodiversity. *Oceanis* 24: 223-238.
- Christensen O.B., Christensen J.H., 2004.** Intensification of extreme European summer precipitation in warmer climate. *Global Planet Change* 44: 107-117.
- Claquin P., Probert I., Lefebvre S., Veron B., 2008.** Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquatic Microbial Ecology* 51: 1-11.
- Claquin P., Longphurt S.N., Foullaron P., Huonnic P., Ragueneau O., Klein C., Leynaert A., 2010.** Effects of simulated benthic fluxes on phytoplankton dynamic and photosynthetic parameters in a mesocosm experiment (Bay of Brest, France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 86: 93-101.
- Claustre H., 1994.** The trophic status of various oceanic provinces as revealed by phytoplankton pigment signatures. *Limnology and Oceanography* 39 (5): 1206-1210.
- Claustre H., Moline M.A., Prezelin B.B., 1997.** Sources of variability in the column photosynthetic cross section for Antarctic coastal waters. *Journal of Geophysical Research* 102 (C11): 25 047-25 060.
- Clements W.H., Rohr J.R., 2009.** Community responses to contaminants: Using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1789-1800.
- Clements W.H., Hickey C.W., Kidd K.A., 2012.** How do aquatic communities respond to contaminants? It depends on the ecological context. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31: 1932-1940.
- Clewell A.F., Aronson J., 2010.** Restauration Ecologique: Principes, Valeurs, et Structure d'une Profession Emergente. Actes Sud. Arles, France: 340 p.

- Cloern J.E., 1996.** Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: a review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Reviews of Geophysics* 34: 127-168.
- Cloern J.E., 1999.** The relative importance of light and nutrient limitation of phytoplankton growth: a simple index of coastal ecosystem sensitivity to nutrient enrichment. *Aquatic Ecology* 33: 3-16.
- Cloern J.E., 2001.** Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210: 222–253.
- Cloern J.E., Dufford R., 2005.** Phytoplankton community ecology: principles applied in San Francisco Bay. *Marine Ecology Progress Series* 285: 11-28.
- Cobbett C.S., 2000.** Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 211-216.
- Codd G.A., 2000.** Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering* 16: 51-60.
- Collier J.L., Campbell L., 1999.** Flow cytométrie in molecular aquatic ecology. *Hydrobiologia* 401: 33-53.
- Collos Y., 1986.** Time-lag algal growth dynamics: biological constraints on primary production in aquatic environments. *Marine Ecology Progress Series* 33 : 193-206.
- Collos Y., Gagne C., Laabir M., Vaquer A., Cecchi P., Souchu P., 2004.** Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *Journal of Phycology* 40: 96-103.
- Collos Y., Husseini-Ratrema J., Bec B., Vaquer A., Lam Hoai T., Rougier C., Pons V., Souchu P., 2005.** Pheopigment dynamics, zooplankton grazing rates and the autumnal ammonium peak in a Mediterranean lagoon. *Hydrobiologia* 550: 83-93.
- Collos Y., Bec B., Jauzein C., Abadie E., Laugier T., Lautier J., Pastoureaud A., Souchu P., Vaquer A., 2009.** Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *Journal of Sea Research* 61: 68-75.
- Costanza R., d'Arge R., de Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., Oneill R.V., Paruelo J., Raskin R.G., Sutton P., van den Belt M., 1997.** The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-260.

- Costanza R., d'Arge R., De Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O'Neill R., Paruelo J., Raskin R.G., Sutton P., Van den Belt M., 1997.** The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-260.
- Couté A., 1982.** Ultrastructure d'une cyanophycée aérienne calcifiée cavernicole : *Geitleria calcarea* Friedman (Hormogonophycideae, Stigonematales, Stigonemataceae). *Hydrobiologia* 97: 255-274.
- Couté A., Franceschini I.M., 1998.** Scale bearing chrysophytes from acid waters of Florianopolis, Santa Catarina Island, South Brazil. *Algological Studies* 88: 37-66.
- Couté A., 2002.** Biologie et microscopie électronique à balayage. *Mémoires de la Société Entomologique de France* 6: 31-44
- Couté A., Tell G., 1981.** Ultrastructure de la paroi cellulaire des Desmidiacées au microscope électronique à balayage. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 68: 7-228.
- Crise A., Allen J.I., Baretta J., Crispi G., Mosetti R., Solidoro C., 1999.** The Mediterranean pelagic ecosystem response to physical forcing. *Progress in Oceanography* 44: 219-243.
- Crow M.E., Taub F.B., 1979.** Designing a microcosm bioassay to detect ecosystem level effects. *International Journal of Environmental Studies* 13: 141-147.
- Cruz S., Serôdio J., 2008.** Relationship of rapid light curves of variable fluorescence to photoacclimation and non-photochemical quenching in a benthic diatom. *Aquatic Botany* 88: 256-264.
- D'Ortenzio F., 2003.** Space and time occurrence of algal blooms in the Mediterranean: their significance for the trophic regime of the basin. PhD thesis, University of London: 302 p.
- D'Ortenzio F., Ribera d'Alcalà M., 2009.** On the trophic regimes of the Mediterranean Sea: a satellite analysis. *Biogeosciences* 6: 139-148.
- Dall'Olmo G., Gitelson A.A., 2005.** Effect of bio-optical parameter variability on the remote estimation of chlorophyll-a concentration in turbid productive waters: Experimental results. *Applied Optics* 44 (3): 412-422.
- Darecki M., Stramski D., 2004.** An evaluation of MODIS and SeaWiFS bio-optical algorithms in the Baltic Sea. *Remote Sensing of Environment* 89 (3): 326-350.
- Darwin C., 1859.** The Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life, 1st edn. John Murray, London: 502 p.
- Davison I.R., 1991.** Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of Phycology* 27: 2-8.

- Day J.W., Psuty N.P., Pérez B.C., 2000.** The role of pulsing events in the functioning of coastal barriers and wetlands: implications for human impact, management and the response to sea level rise. In: Weinstein, M.P., Kreeger, D.A. (Eds.), *Concepts and Controversies in Tidal Marsh Ecology*. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht: 633–661.
- de Jonge V.N., Van Beusekom J.E.E., 1995.** Wind- and tide-induced resuspension of sediment and microphytobenthos from tidal flats in the Ems estuary. *Limnology and Oceanography* 40 (4): 766-778.
- de Jonge V.N., Elliott M., Orive E., 2002.** Cause, historical development, effects and future challenges of a common environmental problem : eutrophication. *Hydrobiologia* 475/476: 1-19.
- de la Broise D., Palenik B., 2007.** Immersed in situ microcosms: A tool for the assessment of pollution impact on phytoplankton. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 341: 274-281.
- De Lorenzo M.E., Scott G.I., Ross P.E., 2001.** Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 84-98.
- De Lorenzo M.E., Fleming J., 2008.** Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 203-210.
- Deblois C.P., Juneau P., 2010.** Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiances. *Harmful Algae* 9: 8-24.
- Del Amo Y., Quéguiner P., Tréguer P., Breton H., Lampert L., 1997.** Impact of high-nitrate freshwater inputs on macrotidal ecosystems. II. Specific role of the silicic pump in the year-round dominance of diatoms in the bay of Brest (France). *Marine Ecology Progress Series* 161: 225-237.
- Delgado M., Latasa M., Estrada M., 1992.** Variability in the size-fractionated distribution of the phytoplankton across the Catalan front of the north-west Mediterranean. *Journal of Plankton Research* 14: 753-771.
- Derraz M., Dauta A., Capblancq J., Abassi M., 1995.** Influence de la lumière et de la température sur les taux de croissance et de photosynthèse de *Scenedesmus crassus*

- Chodat, isolée de la retenue eutrophe El Kansera (Maroc). *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 31(1): 65-74.
- Descolas-Gros C., Oriol L., 1992.** Variations in carboxylase activity in marine phytoplankton cultures. β -carboxylation in carbon flux studies. *Marine Ecology Progress Series* 85: 163.
- Doblin M.A., Petrou K.L., Shelly K., Westwood K., van den Enden R., Wright S., Griffiths B., Ralph P.J., 2011.** Diel variation of chlorophyll-*a* fluorescence, phytoplankton pigments and productivity in the Sub-Antarctic and Polar Front zones south of Tasmania, Australia. *Deep Sea Research part II* 58: 2189-2199.
- Dorigo U., Bourrain X., Bérard A., Leboulanger C., 2004.** Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Science of the Total Environment* 318: 101-114.
- DRAE, 1989.** Tableau de bord de l'environnement corse. D.R.A.E. édit.: 350p.
- Drake J.L., Carpenter E.J., Cousins M., Nelson K.L., Guido-Zarate A., Loftin K., 2010.** Effects of light and nutrients on seasonal phytoplankton succession in a temperate eutrophic coastal lagoon. *Hydrobiologia* 654: 177-192.
- Dronkers J., Zimmerman J.T.F., 1982.** Some principles of mixing in tidal lagoon. In : Lasserre P., Postma H. eds. Proc. Int. Symp. On coastal lagoons. SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, France. *Oceanologica Acta* N°SP: 107-117.
- Duarte C.M., 1995.** Submerged aquatic vegetation in relation to different nutrient regimes. *Ophelia* 41: 87-112.
- Duarte C.M, Agusti S., Kennedy H., Vaque D., 1999.** The Mediterranean climate as a template for Mediterranean marine ecosystems: the example of the northeast Spanish littoral. *Progress in Oceanography* 44: 245-270.
- Duarte C.M., Conley D., Carstensen J., Sánchez-Camacho M., 2009.** Return to Neverland: Shifting baselines affect eutrophication restoration targets. *Estuaries and Coasts* 32: 29-36.
- Duarte P., Filomena-Macedo M., Cancela-da-Fonseca L., 2006.** The relationship between phytoplankton diversity and community function in a coastal lagoon. *Hydrobiologia* 555: 3-18.
- Dubelaar G.B.J., Groenewegen A.C., Stokdijk W., Van Den Engh G.J., Visser J.W.M., 1989.** Optical plankton analyser: A flow cytometer for plankton analysis, II: Specifications. *Cytometry* 10: 529-539.

- Dubelaar G.B.J., Geerders P.J.F., Jonker R.R., 2004.** High frequency monitoring reveals phytoplankton dynamics. *Journal of Environmental Monitoring* 6: 946-952.
- Dubroca L., 2011.** Amélioration et définition de nouveaux indices de composition phytoplanctonique pour les masses d'eau de transition méditerranéennes dans le cadre de la DCE. Rapport final ONEMA: 125 p.
- Dussart B.H., 1965.** Les différentes catégories de plancton. *Hydrobiologia* 26: 72-74.
- Duxbury J., Dickinson S., 2007.** Principles for sustainable governance of the coastal zone: In the context of coastal disasters. *Ecological Economics* 63: 319-330.
- Egan D., Howell E.A., 2001.** The historical ecology handbook: a restorationist's guide to reference ecosystems. Island Press, Washington, D.C.
- Elliott M., Burdon D., Hemingway K.L., Apitz S.E., 2007.** Estuarine, coastal and marine ecosystem restoration: Confusing management and science-A revision of concepts. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 74: 349-366.
- El-Sabaawi R., Harrison P.J., 2006.** Interactive effects of irradiance and temperature on the photosynthetic physiology of the pennate diatom *Pseudo-Nitzschia granii* (Bacillariophyceae) from the northeast subarctic pacific. *Journal of Phycology* 42: 778-785.
- Eppley R.W., 1972.** Temperature and phytoplankton growth rates in the sea. *Fishery Bulletin* 70: 1063-1085.
- Estrada M., 1991.** Phytoplankton assemblages across a NW Mediterranean front: changes from winter mixing to spring stratification. In: Homage to Ramon Margalef; or, Why there is such pleasure in studying nature. In: Ros, J. and Pratt, N. (eds). *Oceanologia Aquatica* 10: 157-185.
- Estrada M., 1996.** Primary production in the northwestern Mediterranean. *Scientia Marine* 60 (2): 55-64.
- Estrada M., Varela R., Salat J., Cruzado A., Arias E., 1999.** Spatio-temporal variability of the winter phytoplankton distribution across the Catalan and North Balearic fronts (NW Mediterranean). *Journal of Plankton Research* 21: 1-20.
- Eullauffroy P., Vernet G., 2003.** The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. *Water Research* 37: 1983-1990.

- European Environment Agency, 1999.** State and pressures of the marine and coastal Mediterranean environment. European Environment Agency, Copenhagen, Denmark.
- European Union, 2000.** Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for the Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Community, 22/10/2000, 327: 1-73.
- Falkowski P., 1984.** Physiological responses of phytoplankton to natural light regimes. *Journal of Plankton Research* 6: 295-307.
- Falkowski P.G., Kolber Z., 1995.** Variations in chlorophyll yields in phytoplankton in the world oceans. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 341-355.
- Falkowski P.G., Raven J.A., 2007.** Aquatic photosynthesis, 2nd edition. Princeton University Press.
- Fehling J., Davidson K., Bates S.S., 2004.** Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae* 4: 763-769.
- Ferrier C, Rassoulzadegan F., 1991.** Density-dependent effects of protozoans on specific growth rates in pico and nanoplanktonic assemblages. *Limnology and Oceanography* 36: 657-669.
- Fiala M., Oriol L., 1990.** Light-temperature interactions on the growth of Antarctic diatoms. *Polar Biology* 10: 629-636.
- Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P., 1998.** Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281: 237-240.
- Finkel Z.V., 2001.** Light absorption and size scaling of light-limited metabolism in marine diatoms. *Limnology and Oceanography* 46: 86-94.
- Finkel Z.V., Irwin A.J., Schofield O., 2004.** Resource limitation alters the 3/4 size scaling of metabolic rates in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 273: 269-279.
- Foden J., Devlin M.J., Mills D.K., Malcolm S.J., 2010.** Searching for undesirable disturbance: an application of the OSPAR eutrophication assessment method to marine waters of England and Wales. *Biogeochemistry*: 19 p.
- Forbes V.E., Forbes T.L., 1994.** Ecotoxicology in Theory and Practice: A Critique of Current Approaches. Chapman & Halls, ed., *Ecotoxicology Series*: 364 p.

- Fouilland E., Courties C., Descolas-Gros C., 2001.** Size-fractionated carboxylase activities during a 32 h cycle at 30 m depth in the north-western Mediterranean Sea after an episodic wind event. *Journal of Plankton Research* 23(6): 623-632.
- Frisoni G.F., 1984.** Contribution à l'étude du phytoplancton dans le domaine paralique. Thèse de doctorat, U.S.T.L., Montpellier: 171 p.
- Frisoni G.F., 1987.** L'influence du bassin versant sur le fonctionnement des lagunes méditerranéennes concepts d'eutrophisation et de confinement. Exemple d'application: l'étang de Santa Guilia (Corse). *Bulletin d'Ecologie* 18: 169-175.
- Frisoni G., Guelorget O., Perthuisot G.P., 1984.** Ecological diagnosis applied to biological development of Mediterranean coastal lagoons: methodological approach. Studies and reviews. *General Fisheries Council for the Mediterranean* 61: 39-95.
- Frisoni G.F., Dutrieux E., 1992.** L'étang de Biguglia: diagnostic écologique 1991-1992. Rapport IARE, Montpellier, France: 167pp.
- Frontier S., Le Fèvre J., Pichod-Viale D., 1992.** Hiérarchies, dépendances d'échelles et transferts d'échelles en océanographie. In : Auger P, Baudry J, Fournier F, Cahors F (Eds.), Hiérarchies et échelles en écologie. Naturalia publications, Paris: 187-223.
- Fu F.X., Warner M.E., Zhang Y., Feng Y., Hutchins D.A., 2007.** Effects of increased of temperature and CO₂ on photosynthesis, growth and elemental ratios in marine *Synechococcus* and *Prochlorococcus* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 43: 485-496.
- Furnas M.J., 1991.** Net *in situ* growth rates of phytoplankton in an oligotrophic, tropical shelf ecosystem. *Limnology and Oceanography* 36: 13-29.
- Gailhard I., Durbec J.P., Beliaeff B., Sabatier R., 2003.** Ecologie du phytoplancton sur les côtes françaises : comparaison inter-sites. *C.R. Biology* 326: 853-863.
- Garrido M., Cecchi P., Vaquer A., Pasqualini V., 2013.** Effects of sample conservation on assessments of the photosynthetic efficiency of phytoplankton using PAM fluorometry. *Deep Sea Research Part I* 71: 38-48. doi: 10.1016/j.dsr.2012.09.004.
- Geffard O., Budzinski H., His E., 2002.** The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bioaccumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11: 403-416.

- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R., 1989.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990 : 87-92.
- GEOMORPHIC, 2003.** Sources de pollution et vulnérabilités sur le périmètre du S.A.G.E. de l'étang de Biguglia (Haute-Corse). Conseil Général de la Haute-Corse: 147 pp.
- Gerber L.R., Berger M., McCarthy M.A., Possingham H.P., 2005.** A theory for optimal monitoring of marine reserves. *Ecology Letters* 8: 829-837.
- Gibson J.A.E., Garrick R.C., Burton H.R., McTaggart A.R., 1990.** Dimethylsulfide and the alga *Phaeocystis pouchetii*. *Marine Biology* 104:339-346.
- Giddings J.M., Eddlemon G.K., 1979.** Some ecological and experimental properties of complex aquatic microcosms. *International Journal of Environmental Studies* 13: 119-123.
- Giesen W.B.J.T., Katwijk Van M.M., Hartog Den C., 1990.** Eelgrass condition and turbidity in the Dutch Wadden Sea. *Aquatic Botany* 37: 71-85.
- Goericke R., Montoya J.P., 1998.** Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll a in the field – variations of pigment ratios under nutrient and light limited growth. *Marine Ecology Progress Series* 169: 97-112.
- Goericke R., Repeta D.J., 1993.** Chlorophylls *a* and *b* and divinyl chlorophylls *a* and *b* in the open subtropical North Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 101: 307-313.
- Goffart A., 1992.** Influence des contraintes hydrodynamiques sur la structure des communautés phytoplanctoniques du bassin Liguro-Provençal (secteur Corse). Thèse de doctorat, Université de Liège: 163p.
- Goffart A., Hecq J.H., Prieur L., 1995.** Contrôle du phytoplancton du Bassin Ligure par le Front Liguro-Provençal (secteur corse). *Oceanologica Acta* 18: 329-342.
- Goffart A., Catalano G., Hecq J.H., 2000.** Factors controlling the distribution of diatoms and *Phaeocystis* in the Ross Sea. *Journal of Marine Systems* 27: 161-175.
- Goffart A., Hecq J.H., Legendre L., 2002.** Changes in the development of the winter-spring phytoplankton bloom in the Bay of Calvi (NW Mediterranean) over the last two decades: a response to changing climate? *Marine Ecology Progress Series* 236: 45-60.
- Gohin F., 2011.** Annual cycles of chlorophyll a, non-algal suspended particulate matter and turbidity observed from space and in situ coastal waters. *Ocean Science* 7: 705-732.

- Gomez F., Gorsky G., 2003.** Annual microplankton cycles in Villefranche Bay, Ligurian Sea, NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research* 25: 323-339.
- Goto N., Kihira M., Ishida N., 2008.** Seasonal distribution of photosynthetically active phytoplankton using pulse amplitude modulated fluorometry in the large monomictic Lake Biwa, Japan. *Journal of Plankton Research* 30 (10): 1169-1177.
- Graneli E., Turner J.T., 2006.** Ecology of Harmful Algae. Springer, Berlin.
- Gravina M.F., Ardizzone G.D., Scaletta F., Chimenz C., 1989.** Descriptive analysis and classification of benthic communities in some Mediterranean coastal lagoons (Central Italy). Pubblicazioni della Stazione zoologica di Napoli: *Marine Ecology* 10: 141-166.
- Gray J.S., 1997.** Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation* 6: 153-175.
- Green R.E., Balmford A., Crane P.R., Mace G.M., Reynolds J.D., Turner R.K., 2005.** A Framework for Improved Monitoring of Biodiversity: Responses to the World Summit on Sustainable Development. *Conservation Biology* 19: 56-65.
- Gregor J., Maršálek B., 2004.** Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of *in vitro*, *in vivo* and *in situ* methods. *Water Research* 38 (3): 517-522.
- Gregor J., Geriš R., Maršálek B., Heteša J., Marvan P., 2005.** *In situ* quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. *Hydrobiologia* 548 (1): 141-151.
- Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H., 1985.** Phytochelatins: The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- Groom Q.J., Baker N.R., 1992.** Analysis of light-induced depressions of photosynthesis in leaves of a wheat crop during the winter. *Plant Physiology* 100: 1217-1223.
- Grzebyk D., Berland D., 1996.** Influences of temperature, salinity and irradiance on growth of *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) from the Mediterranean Sea. *Journal of Plankton Research* 18: 1837-1849.
- Guasch H., Alti G., Bonet B., Corcoll N., Leira M., Serra A., 2010.** Discharge and the response of biofilms to metal exposure in Mediterranean rivers. *Hydrobiologia* 657: 143-157.
- Guasch H., Sabater S., 1998.** Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology* 34: 233-241.

- Guelorget O., Frisoni G.F., Perthuisot J.P., 1983.** La zonation biologique des milieux lagunaires: definition d'une échelle de confinement dans le domaine paralytique méditerranéen. *Journal de Recherche Océanographique* 8 (1): 15-36.
- Guelorget O., Perthuisot J.P., 1992.** Paralytic ecosystems. Biological organization and functioning. *Vie et Milieu* 42: 215-251.
- Guiselin N., 2010.** Etude de la dynamique des communautés phytoplanctoniques par microscopie et cytométrie en flux, en eaux côtières de la Manche orientale. Thèse de doctorat, Université du Littoral côte d'Opale, France: 237 p.
- Hajdu S., Pertola S., Kuosa H., 2005.** *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) in the Baltic Sea: its occurrence and morphology. *Harmful Algae* 4: 471–480.
- Halpern B.S., Walbridge S., Selkoe K.A., Kappel C.V., Micheli F., D'Agrosa C., Bruno J.F., Casey K.S., Ebert C., Fox H.E., Fujita R., Heinemann D., Lenihan H.S., Madin E.M.P., Perry M.T., Selig E.R., Spalding M., Steneck R., Watson R., 2008.** A global map of human impacts on marine ecosystems. *Science* 319: 948-952.
- Hancke K., Hancke B.T., Olsen M.L., Johnsen G., Glud N.R., 2008.** Temperature effects on microalgal photosynthesis-light responses measured by O₂ production, Pulse-Amplitude-Modulated fluorescence and C¹⁴ assimilation. *Journal of Phycology* 44: 501-514.
- Havskum H., Schlüter L., Scharek R., Berdalet E., Jacquet S., 2004.** Routine quantification of phytoplankton groups-microscopy or pigment analyses? *Marine Ecology Progress Series* 273: 31-42.
- Hays G.C., Richardson A.J., Robinson C., 2005.** Climate change and marine plankton. *Ecology and Evolution* 20 (6): 337-344.
- Hecky R.E., Kilham P., 1988.** Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography* 33: 796-822.
- Hecq J.H., 2003.** Modélisation Conceptuelle et Numérique de l'Ecosystème Planctonique Océanique. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 72 (2-3-4): 93-302.
- Heil C.A., Glibert P.M., Fan C., 2005.** *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller: A review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance. *Harmful Algae* 4: 449-470.

- Hoffmann L.J., Peeken I., Lochte K., 2007.** Effects of iron on the elemental stoichiometry during EIFEX and in the diatoms *Fragilariopsis kerguelensis* and *Chaetoceros dichaeta*. *Biogeosciences Discussion* 4: 249-275.
- Houliez E., Lizon F., Thyssen M., Artigas F.L., Schmitt F.G., 2012.** Spectral fluorometric characterization of Haptophyte dynamics using the FluoroProbe: an application in the eastern English Channel for monitoring *Phaeocystis globosa*. *Journal of Plankton Research* 34 (2): 136-151.
- Howarth R.W., Billen G., Swaney D., Townsend A., Jaworski N., Lajtha K., Downing J.A., Elmgren R., Caraco N., Jordan T., Berendse F., Freney J., Kudeyarov V., Murdoch P., Zhao-Liang Z., 1996.** Regional nitrogen budgets and riverine N and P fluxes for the drainages to the North Atlantic Ocean: natural and human influences. *Biogeochemistry* 35: 75-139.
- Huang Y.J., Jiang Z.B., Zeng J.N., Chen Q.Z., Zhao Y.Q., Liao Y.B., Shou L., Xu X.Q., 2011.** The chronic effects of oil pollution on marine phytoplankton in a subtropical bay, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 176: 517-530.
- Ifremer, 2011.** Réseau de Suivi Lagunaire du Languedoc-Roussillon : Bilan des résultats 2010. Rapport RSL-11/2011: 275 p.
- Ihnken S., Eggert A., Beardall J., 2010.** Exposure times in rapid light curves affect photosynthetic parameters in algae. *Aquatic Botany* 93: 185-194.
- Iriarte A., Purdie D.A., 1994.** Size distribution of chlorophyll *a* biomass and primary production in a temperate estuary (Southampton Water): the contribution of photosynthetic picoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 115: 283-297.
- Jacques G., 1968.** Aspects quantitatifs du phytoplancton de Banyuls sur Mer (Golfe du Lion). III – Diatomées et Dinoflagellés de juin 1965 à juin 1968. *Vie et Milieu* 20 : 91-126.
- Jacquet S., Lennon J.F., Marie D., Vaulot D., 1998.** Picoplankton population dynamics in coastal waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography* 43 (8): 1916-1931.
- Jakob T., Schreiber U., Kirchesch V., Langner U., Wilhelm C., 2005.** Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits. *Photosynthesis Research* 83: 343-361.

- Jamet J.L., Jean N., Bogé G., Richard S., Jamet D., 2005.** Plankton succession and assemblage structure in two neighbouring littoral ecosystems in the north-west Mediterranean Sea. *Marine and Freshwater Research* 56: 69-83.
- Janssens M., 2000.** Etude *in situ* de la production primaire des macroalgues d'une baie méditerranéenne et influences dans le cycle du carbone. Thèse de doctorat, Université de Liège: 269p.
- Jarry V., Fiala M., Frisoni G.F., Jacques G., Neveux J., Panouse M., 1990.** The spatial distribution of phytoplankton in a Mediterranean lagoon (Etang de Thau). *Oceanologica Acta* 13 (4): 503-512.
- Jarry V., Frisoni G.F., Legendre P., 1991.** Spatial organization of a lagoon phytoplankton population (Thau Lagoon, Herault, France) under marine and continental influences. *Oceanologica Acta* 14 (5): 473-488.
- Jeffrey S.W., 1976.** A report of green algal pigments in the central North Pacific Ocean. *Marine Biology* 37: 33-37.
- Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Bjørnland T., 1997.** Data for the identification of 47 key phytoplankton pigments. In: Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W., (Eds), *Phytoplankton pigments in oceanography*, UNESCO, Paris: 447-559.
- Jeffrey S.W., Vesik M., 1997.** Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods*, S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura and S.W. Wright (eds), UNESCO: 33-84.
- Jeffrey S.W., Wright S.W., Zapata M., 1999.** Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Marine Freshwater Research* 50: 879-896.
- Johnson P.W., Sieburth J.Mc.N., 1979.** Chroococcoid cyanobacteria in the sea: A ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnology and Oceanography* 24: 928-935.
- Jouini Z., Ben Charrada R., Moussa M., 2005.** Characteristics of the South Lake of Tunis after restoration. *Marine Life* 15: 3-11.
- Juneau P., El-Berdey A., Popovic R., 2002.** PAM Fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42: 155-164.
- Justic D., Rabalais N.N., Turner R.E., 1995.** Stoichiometric nutrient balance and origin of coastal eutrophication. *Marine Pollution Bulletin* 30: 41-46.

- Kashino Y., Koike H., Yoshio M., Egashira H., Ikeuchi M., Pakrasi H.B., Satoh K., 2002.** Low-molecular-mass polypeptide components of a Photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiology* 43(11): 1366-1373.
- Kiefer D.A., 1973.** Fluorescence properties of natural phytoplankton populations. *Marine Biology* 22: 263-269.
- Kimball K.D., Levin S.A., 1985.** Limitations of laboratory bioassays: the need for ecosystem-level testing. *Bioscience* 35: 165-171.
- Kiorboe T., 1995.** Small-scale turbulence, marine snow formation, and planktivorous feeding. *Scientia Marina* 61: 141-158.
- Kitajima M., Butler W.L., 1975.** Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta* 376: 105-115.
- Kjerfve B., 1994.** Coastal Lagoon Processes. Elsevier, *Oceanography Series*: Amsterdam: 577 p.
- Kleppel G.S., Pieper R.E., 1984.** Phytoplankton pigments in the gut contents of planktonic copepods from coastal waters of southern California. *Marine Biology* 78: 193-198.
- Kleppel G.S., Frazel D., Pieper R.E., Holliday D.V., 1988.** Natural diets of zooplankton off southern California. *Marine Ecology Progress Series* 49: 231-241.
- Knauer K., Sobek A., Bucheli T.D., 2007.** Reduced toxicity of diuron to the freshwater green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in the presence of black carbon. *Aquatic Toxicology* 83: 143-148.
- Knauert S., Dawo U., Hollender J., Hommen U., Knauer K., 2009.** Effects of photosystem II inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 836-845.
- Kolber Z.S., Falkowski P.G., 1993.** Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. *Limnology and Oceanography* 38: 1646-1665.
- Kolbowski J., Schreiber U., 1995.** Computer-controlled phytoplankton analyzer based on a 4-wavelengths PAM chlorophyll fluorometer. In P. Mathis (ed), *Photosynthesis: from light to biosphere*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Körner S., Nicklisch A., 2002.** Allelopathic growth inhibition of selected phytoplankton species by submerged macrophytes. *Journal of Phycology* 38: 862-871.

- Krause G.H., Weis E., 1984.** Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* 5: 139-157.
- Krause G.H., Weis E., 1991.** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Krom M.D., Kress N., Brenner S., Gordon L., 1991.** Phosphorous limitation of primary productivity in the Eastern Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*, 36: 424–432.
- Kromkamp J., Peene J., 1999.** Estimation of phytoplankton photosynthesis and nutrient limitation in the Eastern Scheldt estuary using variable fluorescence. *Aquatic Ecology* 33: 101-104.
- Kruskopf M., Flynn K.J., 2006.** Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate. *New Phytologist* 169: 525-536.
- La Jeunesse I., Deslous-Paoli J.M., Ximénès M.C., Cheylan J.P., Mende C., Borrero C., Scheyer L., 2002.** Changes in point and non-point sources phosphorus loads in the Thau catchment over 25 years (Mediterranean Sea – France). *Hydrobiologia*: 403-411.
- Laabir M., Jauzein C., Genovesi B., Masseret E., Grzebyk D., Cecchi P., Vaquer A., Perrin Y., Collos Y., 2011.** Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research* 33 (10): 1550-1563.
- Lampert L., 2001.** Dynamique saisonnière et variabilité pigmentaire des populations phytoplanctoniques dans l’atlantique nord (Golfe de Gascogne). Thèse de doctorat, IFREMER, France : 351 p.
- Larsen A., Fonnes Flaten G.A., Sandaa R.A., Castberg T., Thyraug R., Rune Erga S., Jacquet S., Bratbak G., 2004.** Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: microbial community succession and diversity. *Limnology and Oceanography* 49: 180-190.
- Lasternas S., Tunin-Ley A., Ibanez F., Andersen V., Pizay M.D., Lemée R., 2011.** Short-term dynamics of microplankton abundance and diversity in NW Mediterranean Sea during late summer conditions (DYNAPROC 2 cruise; 2004). *Biogeosciences* 8: 743-761.

- Latimer J.S., Davis W.R., Keith D.J., 1999.** Mobilization of PAHS and PCBs from in-place contaminated marine resuspension events. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 49: 577-595.
- Laviale M., Prygiel J., Creach A., 2010.** Light modulated toxicity of isoproturon toward natural stream periphyton photosynthesis: A comparison between constant and dynamic light conditions. *Aquatic Toxicology* 97: 334-342.
- Lawrenz E., Pinckney J.L., Ranhofer M.L., MacIntyre H.L., Richardson T.L., 2010.** Spectral Irradiance and Phytoplankton Community Composition in a Blackwater-Dominated Estuary. Winyah Bay, South Carolina, USA, *Estuaries and Coasts*, 33: 1186-1201.
- Le Bec C., Belin C., Gaertner J.C., Beliaeff B., Raffin B., Ibanez F., 1997.** Time series of the French phytoplankton monitoring network (REPHY). Study of two zones of the West Mediterranean coast. *Oceanologica Acta* 20 (1): 101-107.
- Leboulanger C., Rimet F., de Lacotte M.H., Bérard A., 2001.** Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environment International* 26: 131-135.
- Leboulanger C., Dorigo U., Jacquet S., Le Berre B., Paolini G., Humbert J.F., 2002.** Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquatic Microbial Ecology* 30: 83-89.
- Leboulanger C., Bouvy M., Pagano M., Dufour R.A., Got P., Cecchi P., 2009.** Responses of planktonic microorganisms from tropical reservoirs to paraquat and deltamethrin exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56: 39-51.
- Leboulanger C., Bouvy M., Carré C., Cecchi P., Amalric L., Bouchez A., Pagano M., Sarazin G., 2011.** Comparison of the Effects of Two Herbicides and an Insecticide on Tropical Freshwater Plankton in Microcosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 61 (4): 599-613.
- Legrand C., Rengefors K., Fistarol G.O., Graneli E., 2003.** Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* 42 (4): 406-419.
- Lenzi M., Palmieri R., Porrello S., 2003.** Restoration of the eutrophic Orbetello lagoon (Tyrrhenian Sea, Italy): water quality management. *Marine Pollution Bulletin* 46: 1540-1548.
- Levin L.A., Boesch D.F., Covich A., Dahm C., Erseus C., Ewel K.C., Kneib R.T., Moldenke A., Palmer M.A., Snelgrove P., Strayer D., Weslawski J.M., 2001.** The function of marine

- critical transition zones and the importance of sediment biodiversity. *Ecosystems* 4: 430-451.
- Lévy M., Mémery L., André J.M., 1998.** Simulation of primary production and export fluxes in the Northwestern Mediterranean Sea. *Journal of Marine Research* 56: 197-238.
- Li A., Stoecker D.K., Coats D.W., Adam E.J., 1996.** Ingestion of fluorescently labeled and phycoerythrin-containing prey by mixotrophic dinoflagellates. *Aquatic Microbial Ecology* 10: 139-147.
- Li W., 2002.** Macroecological patterns of phytoplankton in the northwestern North Atlantic Ocean. *Nature* 419: 154–157.
- Lippemeier S., Harting P., Colijn F., 1999.** Direct impact of silicate on the photosynthetic performance of the diatom *Thalassiosira weissflogii* assessed by on- and off-line PAM fluorescence measurements. *Journal of Plankton Research* 21: 269-283.
- Litchman E., Klausmeier C.A., Schofield O.M., Falkowski P.G., 2007.** The role of functional traits and trade offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecology letters* 10: 1170-1181.
- Litchman E., Klausmeier C.A., 2008.** Trait-based community ecology of phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematic* 39: 615-639.
- Lloret J., 2010.** Human health benefits supplied by Mediterranean marine biodiversity. *Marine Pollution Bulletin* 60 (10): 1640-1646.
- Long E.R., Macdonald D.D., Smith S.L., Calder F.D., 1995.** Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19: 81-97.
- Longhurst A., 1995.** Seasonal cycles of pelagic production and consumption. *Progress in Oceanography* 36 (2): 77-167.
- Lorenzen C.J., 1967.** Determination of chlorophyll and pheopigments by spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography* 12: 343-346.
- Lotze H.K., Lenihan H.S., Bourque B.J., Bradbury R.H., Cooke R.G., Kay M.C., Kidwell S.M., Kirby M.X., Peterson C.H., Jackson J.B.C., 2006.** Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science* 312: 1806-1809.
- Lund J.W.G., Kipling C., Le Cren E.D., 1958.** The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11: 143-170.

- MacCaull W.A., Platt T., 1977.** Diel variations in the photosynthetic parameters of coastal marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 22(4): 723-731.
- Macinnis-Ng C.M.O., Ralph P.J., 2004.** *In situ* impact of multiple pulses of metal and herbicide on the seagrass, *Zostera capricorni*. *Aquatic Toxicology* 67: 227-237.
- MacIntyre H.L., Lawrenz E., Richardson T.L., 2010.** Taxonomic discrimination of phytoplankton by spectral fluorescence. In: Suggett, D.J. *et al.* (ed), Chlorophyll a Fluorescence in *Aquatic Sciences: Methods and Applications*: 129-169.
- Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., 1983.** The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 151: 297-314.
- Margalef R., 1958.** Temporal succession and spatial heterogeneity in phytoplankton. *Perspectives in marine biology*. Ed. A.A., University of California Press, Berkeley: 323-349.
- Margalef R., 1978.** Life forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* 1: 493-509.
- Margalef R., 1985.** Environmental control of the mesoscale distribution of primary producers and its bearing to primary production in the western Mediterranean. In: Moraitou-Apostolopoulou, M., Kiortsis, V., Ed., *Mediterranean Marine Ecosystems*. Plenum Press, New York: 213-229.
- Margalef R., 1994.** Through the looking glass: how marine phytoplankton appears through the microscope when graded by size and taxonomically sorted. *Scientia Marina* 58 (1-2): 87-101.
- Margalef R., Estrada M., 1987.** Synoptic distribution of summer microplankton (Algae and Protozoa) across the principal front in the western Mediterranean. *Scientia Marina: Investigacion Pesquera* 51 (1): 121-140.
- Marie D., Partensky F., Jacquet S., Vaulot D., 1997.** Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green-I. *Applied and Environmental Microbiology* 93: 186-193.
- Marie D., Partensky F., Vaulot D., Brussaard C., 1999.** Enumeration of phytoplankton, bacteria and viruses in marine samples. In Robinson J.P., Darzynkiewicz D., Dean P.N., Orfao A., Rabinovitch P.S., Stewart C.C., Tanke H.J., Wheelless L.L. (eds) *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, New-York, suppl. 10, Unit 11.11: 1-15.

- Martinez M.L., Intralawan A., Vazquez G., Perez-Maqueoa O., Sutton P., Landgrave R., 2007.** The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. *Ecological Economics of Coastal Disaster - Coastal Disasters Special Edition* 63(2-3): 254-272.
- Marty J.C., Chiaverini J., Pizay M.D., Avril B., 2002.** Seasonal and interannual dynamics of nutrients and phytoplankton pigments in the western Mediterranean Sea at the DYFAMED time-series station (1991–1999). *Deep Sea Research Part II* 49: 1965-1985.
- Marty J.C., Garcia N., Raimbault P., 2008.** Phytoplankton dynamics and primary production under late summer conditions in the NW Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part I* 55: 1131-1149.
- Maxwell K., Johnson G.N., 2000.** Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51(345): 659-668.
- Mendez S.M., 1993.** Uruguayan red tide monitoring programme: preliminary results (1990-1991). In: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier, Amsterdam: 287-291.
- Mercado J.M., Ramirez T., Cortés T., Sebastian T., Vargas-Yaez M., 2005.** Seasonal and inter-annual variability of the phytoplankton communities in an upwelling area of the Alboran Sea (SW Mediterranean Sea). *Scientia Marina* 69: 451-465.
- Miao A.J., Wang W.X., 2006.** Cadmium toxicity to two marine phytoplankton under different nutrient conditions. *Aquatic Toxicology* 78: 114-126.
- Miller C.B., 2004.** Biological Oceanography. Blackwell Publishing, Oxford: 402 p.
- Millie A., Pearl H.W., Hurley J.P., 1993.** Microalgal pigment assessment using HPLC: a synopsis of organismal and ecological applications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic* 50: 2513-2527.
- Millot C., 1999.** Circulation in the western mediterranean sea. *Journal of Marine Systems* 20 (1-4): 423-442.
- Morelli E., Marangi M.L., Fantozzi L., 2009.** A phytochelatin-based bioassay in marine diatoms useful for the assessment of bioavailability of heavy metals released by polluted sediments. *Environment International* 35: 532-538.
- Morris E.P., Kromkamp J.C., 2003.** Influence of temperature on the relationship between oxygen- and fluorescence-based estimates of photosynthetic parameters in a marine benthic diatom (*Cylindrotheca closterium*). *European Journal of Phycology* 38: 133-142.

- Mouillot D., Titeux A., Migon C., Sandroni V., Frodello J.P., Viale D., 2000.** Anthropogenic influences on a Mediterranean Nature Reserve: modelling and forecasting. *Environmental Modeling and Assessment* 5: 185-192.
- Munoz I., Real M., Guasch H., Navarro E., Sabater S., 2001.** Effects of atrazine on periphyton under grazing pressure. *Aquatic Toxicology* 55: 239-249.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B., Kent J., 2000.** Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nelson J.R., 1989.** Phytoplankton pigments in macrozooplankton faeces: variability in carotenoid alterations. *Marine Ecology Progress Series* 52: 129-144.
- Neveux J., Lantoin F., 1993.** Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep-Sea Research* 40: 1747-1765.
- Newton A., Mudge S.M., 2005.** Lagoon-sea, nutrient dynamics and water quality management of the Ria Formosa (Portugal). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 62: 405-414.
- Nicolas E., Migon C., Leblond N., Journel B., 1995.** Seasonality of dry and wet depositions of trace metals in the Ligurian Sea. *Water Pollution Research Reports* 32: 275-285.
- Nixon S.W., 1982.** Nutrients dynamics, primary production and fisheries yields of lagoons. Proc. Int. Symp. On coastal lagoons. SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, France. *Oceanologica Acta* (n°SP): 357-371.
- Nixon S.W., 1986.** Nutrient dynamics and the productivity of marine coastal waters. In: Halwagy, R., Clayton, D., Behbehani, M., (eds.) Marine environment and pollution. The Alden Press, Oxford: 97-115.
- Nixon S.W., 1995.** Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41: 199-219.
- Norro A., 1995.** Etude pluridisciplinaire d'un milieu côtier. Approches expérimentale et modélisation de la Baie de Calvi (Corse). Thèse de doctorat, Université de Liège: 258p.
- Norton T.A., Melkoniam M., Andersen R.A., 1996.** Algal biodiversity. *Phycologia* 35: 308-326.
- Orsoni V., Souchu P., Sauzade D., 2001.** Caractérisation de l'état d'eutrophisation des trois principaux étangs corses (Biguglia, Diana et Urbino), et proposition de renforcement et leur surveillance. Rapport Ifremer, France: 175p.

- Orsoni V., Baldi Y., 2004.** Suivi de la qualité de l'eau dans la Réserve Naturelle de l'Etang de Biguglia. Rapport Ifremer, Bastia: 51 pp.
- Ortmann A.C., Anders J., Shelton N., Gong L.M., Moss A.G., Condon R.H., 2012.** Dispersed oil disrupts microbial pathways in pelagic food webs. doi:10.1371/journal.pone.0042548
- OSPAR Commission, 2008.** Eutrophication Status of the OSPAR Maritime Area. Second OSPAR Integrated Report 327: 108 p.
- Ozer A., Comhaire L., 1988.** Apports de la morphométrie des galets à la connaissance du transport littoral. Exemples en Sardaigne, Ligurie et Corse. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 4-5: 429-440.
- Paerl H.W., 1988.** Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnology and Oceanography* 33: 823-847.
- Paerl H.W., 1996.** A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia* 35: 25-35.
- Paerl H.W., 1997.** Coastal eutrophication and harmful algal blooms: importance of atmospheric deposition and groundwater as "new" nitrogen and other nutrient sources. *Limnology and Oceanography* 42: 1154-1165.
- Paerl H.W., 2000.** Marine Plankton. In : The Ecology of Cyanobacteria. Whitton B.A. and Potts M. (eds). Kluwer Academic Publishers, the Netherlands: 121-148.
- Paerl H.W., Dyble J., Moisander P.H., Noble R.T., Pielher M.F., Pinckney J.L., Steppe T.F., Twomey L., Valdes L.M., 2003.** Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiology Ecology* 46: 233-246.
- Pannard A., Claquin P., Klein C., Le Roy B., Véron B., 2008.** Short-term variability of the phytoplankton community in coastal ecosystem in response to physical and chemical conditions' changes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80: 212-224.
- Parkhill J.P., Maillet G., Cullen J.J., 2001.** Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology* 37: 517-529.
- Pasqualini V., Pergent-Martini C., Fernandez C., Ferrat L., Tomaszewski J.E., Pergent G., 2006.** Wetland monitoring: aquatic plant changes in two Corsican coastal lagoons (Western Mediterranean Sea). *Aquatic Conservation : Marine and Freshwater Ecosystems* 16: 43-60.
- Pastenes C., Horton P., 1996.** Effect of high temperature on photosynthesis in beans. 1. Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 112: 1245-1251.

- Peak J.G., Peak M.J., 1981.** Heterotrophic carbon-dioxide fixation by *Euglena* function of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochimica et Biophysica Acta* 677: 390.
- Pérez M.C., Carrillo. A., 2005.** Picocyanobacteria distribution in the Ebro Estuary (Spain). *Acta botanica Croatica* 64 (2): 237-246.
- Pérez P., Estévez-Blanco P., Beiras R., Fernández E., 2006.** Effect of copper on the photochemical efficiency, growth, and chlorophyll *a* biomass of natural phytoplankton assemblages. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 137-143.
- Perkins R.G., Mouget J.L., Lefebvre S., Lavaud J., 2006.** Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms. *Marine Biology* 149: 703-712.
- Pinazo C., Marsaleix P., Millet B., Estournel C., Kondrachoff V., Vehil R., 2001.** Phytoplankton variability in summer in the Northwestern Mediterranean: Modelling of the wind and freshwater impacts. *Journal of Coastal Research* 17 (1): 146-161.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D., Colepicolo P., 2003.** Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* 39: 1008-1018.
- Polat S., Akiz A., Olgunoğlu M.P., 2005.** Daily variations of coastal phytoplankton assemblages in summer conditions of northeastern Mediterranean (Bay of Iskenderun). *Pakistan Journal of Botany* 37(3): 715-724.
- Pontasch K.W., Niederlehner B.R., Cairns J., 1989.** Comparisons of single-species, microcosm and field responses to a complex effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: 521-532.
- Puigserver M, Monerris N., Pablo J., Alos J., Moya G., 2010.** Abundance patterns of the toxic phytoplankton in coastal waters of the Balearic Archipelago (NW Mediterranean Sea): a multivariate approach. *Hydrobiologia* 644: 145-157.
- Pulina S., Padedda B.M., Sechi N., Luglié A., 2011.** The dominance of cyanobacteria in Mediterranean hypereutrophic lagoons: a case study of Cabras Lagoon (Sardinia, Italy). *Scientia Marina* 75 (1): 111-120.
- Quinlan E.L., Philips E.J., 2006.** Phytoplankton assemblages across the marine to low-salinity transition zone in a blackwater dominated estuary. *Journal of Plankton Research* 29 (5): 401-416.

- Raateoja M., Seppälä J., Ylöstalo P., 2004.** Fast repetition rate fluorometry is not applicable to studies of filamentous cyanobacteria from the Baltic Sea. *Limnology and Oceanography* 49(4): 1006-1012.
- Rabalais N.N., Turner R.E., Diaz R.J., Justic D., 2009.** Global change and eutrophication of coastal waters. International Council for the Exploration of the Sea. Published by Oxford Journals: 1528-1537.
- Ralph P.J., Gademann R., 2005.** Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany* 82: 222-237.
- Ralph P.J., McMinn A., Ryan K.G., Ashworth C., 2005.** Short-term effect of temperature on the photokinetics of microalgae from the surface layers of Antarctic pack ice. *Journal of Phycology* 41: 63-769.
- Raven J.A., 1998.** The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Functional Ecology* 12: 503-513.
- Raven J.A., Evans M.C.W., Korb R.E., 1999.** The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynthesis Research* 60: 111-149.
- Reizopoulou S., Nikolaidou A., 2004.** Benthic diversity of coastal brackish-water lagoons in western Greece. *Aquatic Conservation* 14: 93-102.
- Relyea R.A., 2009.** A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159: 363-376.
- Reynolds C.S., 1987.** Cyanobacterial water-blooms. *Advances in Botanical Research* 13: 67-143.
- Reynolds C.S., 2002.** Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24 (5): 417-428.
- Ribera d'Alcalà M., Conversano F., Corato F., Licandro P., Mangoni O., Marina D., Mazzocchi M.G., Modigh M., Montresor M., Nardella M., Saggiomo V., Sarno D., Zingone A., 2004.** Seasonal patterns in plankton communities in a pluriannual time series at a coastal Mediterranean site (Gulf of Naples): an attempt to discern recurrences and trends. *Scientia Marina* 68: 65-83.
- Ricard M., 1987.** Atlas du phytoplancton marin - Volume 2 : Diatomophycées. Editions du CNRS, Paris: 293 p.
- Richardson K., Beardall J., Raven J.A., 1983.** Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytologist* 93: 157-191.

- Richardson T.L., Lawrenz E., Pinckney J.L., Guajardo R.C., Walker E.A., Paerl H.W., MacIntyre H.L., 2010.** Spectral fluorometric characterization of phytoplankton community composition using the Algae Online Analyser. *Water Research* 44: 2461-2472.
- Riedel G.F., Sanders J.G., Breitburg D.L., 2003.** Seasonal variability in response of estuarine phytoplankton communities to stress: Linkages between toxic trace elements and nutrient enrichment. *Estuaries* 26: 323-338.
- Roberts D.A., 2012.** Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments. *Environment International* 40: 230-243.
- Rochelle-Newall E.J., De lesalle B., Mari X., Rouchon C., Torreton J.P., Pringault O., 2008.** Zinc induces shifts in microbial carbon flux in tropical coastal environments. *Aquatic Microbial Ecology* 52: 57-68.
- Rodríguez F., Chauton M., Johnsen G., Andresen K., Olsen L.M., Zapata M., 2006.** Photoacclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. *Marine Biology* 148: 963-971.
- Roether W., Manca B.B., Klein B., Bregant D., Georgopoulos D., Beitzel V., Kovacevic V., Luchetta A., 1996.** Recent changes in the Eastern Mediterranean deep water. *Science* 271: 333–335.
- Rolland A., 2009.** Dynamique et diversité du phytoplancton dans le réservoir de la marne (bassin versant de la seine). Thèse de doctorat, Université de Savoie : 262 p.
- Rolland A., Rimet F., Jacquet S., 2010.** A 2-year survey of phytoplankton in the Marne Reservoir (France): a case study to validate the use of an in situ spectrofluorometer by comparison with algal taxonomy and chlorophyll a measurements. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 398: 19 p.
- Röttgers R., 2007.** Comparison of different variable chlorophyll *a* fluorescence techniques to determine photosynthetic parameters of natural phytoplankton. *Deep-Sea Research* 54(3): 437-451.
- Rousseau V., Leynaert A., Daoud N., Lancelot C., 2002.** Diatom succession, silicification and availability in Belgian coastal waters (southern North Sea). *Marine Ecology Progress Series* 236: 61-73.

- Sakshaug E., Bricaud A., Dandonneau Y., Falkowski P.G., Kiefer D.A., Legendre L., Morel A., Parslow J., Takahshi M., 1997.** Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *Journal of Plankton Research* 19: 1637-1670.
- Sanchez P., Tarazona J.V., 2002.** Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. *Aquatic Toxicology* 60: 249-256.
- Sanders J.G., Cibik S.J., 1988.** Response of chesapeake bay phytoplankton communities to low-levels of toxic-substances. *Marine Pollution Bulletin* 19: 439-444.
- Saulnier I., Mucci A., 2000.** Trace metal remobilization following the resuspension of estuarine sediments: Saguenay Fjord, Canada. *Applied Geochemistry* 15: 191-210.
- Scheffer M., Rinaldi S., Gragnani A., Mur L.R., van Nes E.H., 1997.** On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology* 78: 272-282.
- Scheffer M., Van Nes E.H., 2007.** Shallow lake theory revisited: various alternative regimes driven by climate, nutrients, depth and lake size. *Hydrobiologia* 584: 455-466.
- Scherrer B., 1984.** Biostatique. Ed. Gaëtan Morin, 850 p.
- Schloss I.R., Nozais C., Mas S., van Hardenberg B., Carmack E., Tremblay J.E., Brugel S., Demers S., 2008.** Picophytoplankton and nanophytoplankton abundance and distribution in the southeastern Beaufort Sea (Mackenzie Shelf and Amundsen Gulf) during Fall 2002. *Journal of Marine Systems* 74: 978-993.
- Schlüter L., Mohlenberg F., Havskum H., Larsen S., 2000.** The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll *a* ratios. *Marine Ecology Progress Series* 192: 49-63.
- Schmitt-Jansen M., Altenburger R., 2008.** Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. *Aquatic Toxicology* 86: 49-58.
- Schramm W., 1999.** Factors influencing seaweed responses to eutrophication: some results from EU-projectc EUMAC. *Journal of Applied Phycology* 11: 69-78.
- Schreiber U., 1998.** Chlorophyll fluorescence: new instruments for new applications. In: G. Garab (ed), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (V), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Schreiber U., 2004.** Pulse-amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. In: Papageorgiou, G., Govindjee, (Eds), *Chlorophyll fluorescence: A signature of*

- photosynthesis*. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 279-319.
- Schreiber U., Bilger W., Schliwa U., 1986.** Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51–62
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C., 1994.** Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In E. D. Schulze and M. M. Caldwell (eds), *Ecophysiology of photosynthesis*. ecological studies, Springer Verlag, Berlin.
- See J.H., Campbell L., Richardson T.L., Pinckney J.L., Shen R., 2005.** Combining new technologies for determination of phytoplankton community structure in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Phycology* 41 : 305-310.
- Seguin P., Sheaffer C., Ehlke N., Russelle M., Graham P.H., 2001.** Nitrogen Fertilization and Rhizobial Inoculation Effects on Kura Clover Growth. *Agronomy Journal* 93: 1262-1268.
- Selmer J.S., Ferrier-Pages C., Cellario C., Rassoulzadegan F., 1993.** New and regenerated production in relation to the microbial loop in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series* 100: 71-83.
- SERI (Society for Ecological Restoration International Science & Policy Writing Group), 2004.** The SER International Primer on Ecological Restoration. Society for Ecological Restoration International, Tucson, AZ. URL <http://www.ser.org>.
- Serra A., Corcoll N., Guasch H., 2009.** Copper accumulation and toxicity in fluvial periphyton: The influence of exposure history. *Chemosphere* 74: 633-641.
- Serrano L., Reina M., Martin G., Reyes I., Arechederra A., León D., Toja J., 2006.** The aquatic systems of Doñana (SW Spain): watersheds and frontiers. *Limnetica* 25: 11-32.
- Sieburth J.M., Smetacek V., Lenz J., 1978.** Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography* 23: 1256-1263.
- Simon N., Cras A.L., Foulon E., Lemée R., 2009.** Diversity and evolution of marine phytoplankton. *Compte Rendu de Biologies* 332: 159–170
- Siokou-Frangou I., Christaki U., Mazzocchi M.G., Montresor M., Ribera d’Alcala M., Vaqué D., Zingone A., 2010.** Plankton in the open Mediterranean Sea : a review. *Biogeosciences* 7: 1543-1586.

- Smayda T.J., 1980.** Phytoplankton species succession. In: Morris, I. (Ed.), *The Physiological Ecology of Phytoplankton*. *Ecology* 7: 493-570.
- Smayda T.J., 1990.** Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: *Toxic marine phytoplankton: Proceedings of the 4th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*: 29-40
- Smayda T., 1997a.** What is a bloom? A commentary. *Limnology and Oceanography* 42 (5): 1132-1136.
- Smayda T., 1997b.** Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography* 42, 5, part 2: 1137-1153.
- Smayda T.J., 1998.** Patterns of variability characterizing marine phytoplankton, with examples from Narragansett Bay. *ICES Journal of Marine Science* 55: 562-573.
- Smayda T.J., 2008.** Complexity in the eutrophication-harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae* 8: 140-151.
- Smayda T.J., Reynolds C.S., 2001.** Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *Journal of Plankton Research* 23: 447-461.
- Smith N.P., 1994.** Water, salt and heat balance of coastal lagoons. In: Kjerfve B., ed., *Coastal Lagoon Processes*: 69-101.
- Smith V.H., Tilman G.D., Nekola J.C., 1999.** Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Environment Polls* 100: 179-196.
- Smith V.H., 2006.** Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and phosphorus enrichment. *Limnology and Oceanography* 51: 377-384.
- Solomon K.R., Sibley P., 2002.** New concepts in ecological risk assessment : where do we go from here ? *Marine Pollution Bulletin* 44: 279-285.
- Sommer U., 1984.** The paradox of the plankton: fluctuations of phosphorus availability maintain diversity of phytoplankton in flow-through cultures. *Limnology and Oceanography* 29: 633-636.
- Sorokin Y.I., Sorokin Y.P., Gnes A., 1996.** Structure and functioning of the antropogenically transformed Comacchio lagoonal ecosystem (Ferrara, Italy). *Marine Ecology Progress Series* 133: 57-71.

- Souchu P., Gasc A., Collos Y., Vaquer A., Tournier H., Bibent B., Deslous-Paoli J.M., 1998.** Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Marine Ecology Progress Series* 164: 135-146.
- Souchu P., Vaquer A., Collos Y., Landrein S., Deslous-Paoli J.M., Bibent B., 2001.** Influence of shellfish farming activities on the biogeochemical composition of the water column in Thau lagoon. *Marine Ecology Progress Series* 218: 141-152.
- Souchu P., Bec B., Smith V.H., Laugier T., Fiandrino A., Benau L., Orsoni V., Collos Y., Vaquer A., 2010.** Patterns in nutrient limitation and chlorophyll *a* along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic* 67: 743-753.
- Soudant D., Belin C., 2010.** Evaluation DCE janvier 2010. Élément de qualité : phytoplancton. R.INT.DIR/DYNECO/VIGIES/10-03/DS., 6 tomes : 572 p.
- Sournia A., 1986.** Atlas du Phytoplancton Marin, volume I : Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidophycées. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS, Paris : 1-219.
- Sournia A., Brylinski J.M., Dallot S., Le Corre P., Leveau M., Prieur L., Froget C., 1990.** Fronts hydrologiques au large des côtes françaises: Les sites-ateliers du programme Frontal. *Oceanologica Acta* 13: 413-438.
- Sournia A., Belin C., Berland B., Erard-Le Denn E., Gentien P., Grzebyk D., Marcaillou-Le Baut C., Lassus P., Parensky F., 1991a.** Le phytoplancton nuisible des côtes de France. Ed. Ifremer : 154p.
- Sournia A., Chrétiennot-Dinet M.J., Ricard M., 1991b.** Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? *Journal of Plankton Research* 13: 1093–1099.
- Spatharis S., Tsirtsis G., Danielidis D.B., Do Chi T., Mouillot D., 2007.** Effects of pulsed nutrient inputs on phytoplankton assemblage structure and blooms in an enclosed coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73: 807-815.
- Spatharis S., Tsirtsis G., 2010.** Ecological quality scales based on phytoplankton for the implementation of Water Framework Directive in the Eastern Mediterranean. *Ecology Indicator* 10: 840-847.
- Stachowski-Haberkorn S., 2008.** Méthodes d'évaluation de l'impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huître creuse. Thèse de doctorat, Université de Bretagne Occidentale: 177p.

- Stachowski-Haberkorn S., Becker B., Marie D., Haberkorn H., Coroller L., de la Broise D., 2008.** Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquatic Toxicology* 89: 232-241.
- Stachowski-Haberkorn S., Quiniou L., Beker B., Haberkorn H., Marie D., de la Broise D., 2009.** Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities. *Ecotoxicology* 18: 364-376.
- Stem C., Margoluis R., Salafsky N., Brown M., 2005.** Monitoring and evaluation in conservation: a review of trends and approaches. *Conservation Biology* 19: 295-309.
- Stoecker D.K., Li A., Coast D.W., Gustafson D.E., 1997.** Mixotrophy in the dinoflagellate, *Prorocentrum minimum*. *Marine Ecology Progress Series* 152: 1-16.
- Stramska M., Dickey T.D., 1992.** Variability of bio-optical properties of the Upper Ocean associated with diel cycles in phytoplankton population. *Journal of Geophysical Research* 97(11): 17873-17887.
- Strickland J.D.H., 1968.** Continuous measurement of *in vivo* chlorophyll *a* precautionary note. *Deep Sea Research* 15: 225-227.
- Sverdrup H.U., 1953.** On conditions for the vernal blooming of phytoplankton. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer*, 18: 287-295.
- Tango P.J., Magnien R., Butler W., Lacouture R., Sellner K., Glibert P., Luckenbach M., Poukish C., Lockett C., 2005.** Characterization of impacts and potential effects due to *Prorocentrum minimum* blooms in Chesapeake Bay. *Harmful Algae* 4: 525-531.
- Taub F.B., 1997.** Unique information contributed by multispecies systems: examples from the Standardized Aquatic Microcosm. *Ecological Applications* 7: 1103-1110.
- Thouzeau G., Grall J., Clavier J., Chauvaud L., Jean F., Leynaert A., Ni Longphuirt S., Amice E., Amouroux D., 2007.** Spatial and temporal variability in benthic biogeochemical fluxes in the Thau lagoon associated with macrophytic and macrofaunal distribution. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 72: 432-447.
- Thyssen M., Mathieu D., Garcia N., Denis M., 2008.** Short-term variation of phytoplankton assemblages in Mediterranean coastal waters recorded with an automated submerged flow cytometer. *Journal of Plankton Research* 30 (9): 1027-1040.
- Thyssen M., Beker B., Ediger D., Yilmaz D., Garcia N., Denis M., 2011.** Phytoplankton distribution during two contrasted summers in a Mediterranean harbour: combining

- automated submersible flow cytometry with conventional techniques. *Environmental Monitoring and Assessment* 173: 1-16.
- Tomas C.R., 1997.** Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press: 858 p.
- Torres M.A., Barros M.P., Campos S.C.G., Pinto E., Rajamani S., Sayre R.T., Colepicolo P., 2008.** Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 1-15.
- Travers M., 1971.** Diversité du microplancton du Golfe de Marseille en 1964. *Marine Biology* 8: 308-343.
- Tréguer P., LeCorre, P., 1975.** Manuel d'analyse des sels nutritifs dans l'eau de mer. Utilisation de l'AutoAnalyser II Technicon. 2nd ed., Univ. Bretagne Occidentale, Laboratoire de Chimie marine, Brest, France: 1-110.
- Tsirsis G., Spatharis S., Karydis M., 2008.** Application of the lognormal equation to assess phytoplankton community structural changes induced by marine eutrophication. *Hydrobiologia* 605: 89-98.
- Turner J.T., Ianora A., Miralto A., Laabir M., Esposito F., 2001.** Decoupling of copepod grazing rates, fecundity and egg-hatching success on mixed and alternating diatom and dinoflagellate diets. *Marine Ecology Progress Series* 220: 187-199.
- Uehlinger V., 1964.** Etude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. *Archives des Sciences* 17 (2): 11-223.
- Uitz J., Claustre H., Morel A., Hooker S.B., 2006.** Vertical distribution of phytoplankton communities in open ocean: An assessment based on surface chlorophyll. *Journal of Geophysical research* 111: 23p.
- UNESCO, 2001.** Guide méthodologique d'aide à la gestion intégrée de la zone côtière. Volume II. Des outils et des hommes pour une gestion plus intégrée des zones côtières. Manuels et guides UNESCO n°42.
- Utermöhl H., 1931.** Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons. *Verhandlungen det Internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte limnologie* 5: 567-596.
- Utermöhl H., 1936.** Quantitativen methoden zur Untersuchung des Nannoplanktons. *Handbuch der biologischen arbeitsmethoden* 9: 1879-1937.

- Utermöhl H., 1958.** Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplanktonmethodik. *Mitteilungen der internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie* 9: 1-38.
- Valiela I., Collins G., Kremer J., Lajtha M., Geist M., Seely B., Brawley J., Sham C.H., 1997.** Nitrogen loading from coastal watersheds to receiving estuaries: review of methods and calculation of loading to Waquoit, Bay. *Ecology Applications* 7: 358-380.
- Vaulot D., Frisoni G.F., 1986.** Phytoplanktonic productivity and nutrients in five Mediterranean lagoons. *Oceanologica Acta* 9: 57-63.
- Vaulot D., Courties C., Partensky F., 1989.** A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry* 10: 629-635.
- Vera A., 2005.** Stratégies de développement du Copépode calanoïde *Mixodiaptomus laciniatus* dans un lac de montagne : approche par les biomarqueurs lipidiques et pigmentaires. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France : 341 p.
- Vidal M., Duarte C.M., 2000.** Nutrient accumulation at different supply rates in experimental Mediterranean planktonic communities. *Marine Ecology Progress Series* 207: 1-11.
- Vidussi F., Claustre H., Bustillos-Guzman J., Cailliau C., Marty J.C., 1996.** Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophylla from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research* 18: 2377-2382.
- Vidussi F., Claustre H., Manca B.B., Luchetta A., Marty J.C., 2001.** Phytoplankton pigment distribution in relation to upper thermocline circulation in the eastern Mediterranean Sea during winter. *Journal of Geophysical Research* 106: 19939–19956.
- Vilicic D., Bosak S., Buric Z., Caput-Mihalic K., 2007.** Phytoplankton seasonality and composition along the coastal NE Adriatic Sea during the extremely low Po River discharge in 2006. *Acta Botanica Croatica* 66: 101-115.
- Villena M.J., Romo S., 2003.** Phytoplankton changes in a shallow Mediterranean lake (Albufera of Valencia, Spain) after sewage diversion. *Hydrobiologia* 506, 281-287.
- Walker D.A., Sivak M.N., Prinsley R.T., Cheeseborough J.K., 1983.** Simultaneous measurements of oscillations in oxygen evolution and chlorophyll fluorescence in leaf pieces. *Plant Physiology* 73: 542-549.

- Ward T.J., 2000.** Indicators for assessing the sustainability of Australia's marine ecosystems. *Marine and Freshwater Research* 51: 435-446.
- Webb W.L., Newton M., Starr D., 1974.** Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*. *Oecologia* 17: 281-291.
- White A.J., Critchley C., 1999.** Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research* 59: 63-72.
- White P.S., Walker J.L., 1997.** Approximating nature's variation: selecting and using reference information in restoration ecology. *Restoration Ecology* 5: 338-349.
- Williams N., 1998.** The Mediterranean beckons to Europe's oceanographers. *Science* 279: 483-484.
- Worm B., Barbier E.B., Beaumont N., Duffy J.E., Folke C., Halpern B.S., Jackson J.B.C., Lotze H.K., Micheli F., Palumbi S.R., Sala E., Selkoe K.A., Stachowicz J.J., Watson R., 2006.** Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services. *Science* 314: 787-790.
- Wright S.W., Shearer J.D., 1984.** Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Journal of Chromatography* 294: 281-295
- Wright S.W., Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., Bjornland T., Repeat D., Welschmeyer N., 1991.** Improved HPLC method of the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 77: 183-196.
- Wright S.W., Jeffrey S.W., 1997.** High-resolution HPLC system for chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds) *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO. Paris: 327-360.
- Wu J.T., 1984.** Phytoplankton as bioindicator for water quality in Taipei. *Botanic Bulletin Academia Sinica* 25: 205-214.
- Yentsch C.S., Yentsch C.M., Phinney D.A., Lapointe B.E., Yentsch S.F.W., 2004.** The odyssey of new production. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 300: 15-30.
- Zapata M., Rodriguez F., Garrido J.L., 2000.** Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C-8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series* 195: 29-45.

- Zingone A., Casotti R., Rivera d'Alcala M., Scardi M., Marino D., 1995.** St Martin's summer: the case of an autumn phytoplankton bloom in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Journal of Plankton Research* 17: 575-593.
- Zingone A., Enevoldsen H.O., 2000.** The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean and Coastal Management* 43: 725-748.
- Zingone A., Siano R., D'Alelio D., Sarno D., 2006.** Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 5: 321-337.